



Instituto de
Recursos Naturales
y Agrobiología
de Sevilla



EMPLEO DE CICLODEXTRINAS EN LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DIURÓN. ESTIMACIÓN DE SU RIESGO TÓXICO

Memoria que presenta Marina Rubio Bellido
para optar al título de Doctor por la
Universidad de Sevilla.

Sevilla, Octubre 2014.

Fdo: **Marina Rubio Bellido**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA,
MINERALOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA



Dra. María del Rosario Vaz Pardal, directora del Departamento de Cristalografía,
Mineralogía y Química Agrícola,

CERTIFICA: Que la Lda. D^a Marina Rubio Bellido ha realizado bajo la dirección de los doctores D. Jaime Villaverde Capellán, D^a Esmeralda Morillo González y D^a Leonila Laiz Trobajo el trabajo titulado “EMPLEO DE CICLODEXTRINAS EN LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DIURÓN. ESTIMACIÓN DE SU RIESGO TÓXICO” para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, cumpliendo los requisitos de la legislación vigente.

Firmado:

Dra. María del Rosario Vaz Pardal

Sevilla, Octubre 2014

EMPLEO DE CICLODEXTRINAS EN LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DIURÓN. ESTIMACIÓN DE SU RIESGO TÓXICO

Visado en Sevilla, Octubre 2014

LOS DIRECTORES

Dr. D. Jaime Villaverde Capellán
Científico Titular CSIC

Dra. D^a. Esmeralda Morillo González
Investigadora Científica CSIC

Dra. D^a. Leonila Laiz Trobajo
Científica Titular CSIC

EL TUTOR

Dr. D. Isidoro Ángel Gómez Parrales
Profesor Titular, Universidad de Sevilla



PROFESOR DOCTOR D. JOSÉ MANUEL PARDO PRIETO, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “EMPLEO DE CICLODEXTRINAS EN LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DIURÓN. ESTIMACIÓN DE SU RIESGO TÓXICO”, presentada por D^a Marina Rubio Bellido para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizada en el Departamento de Agroquímica y Conservación de Suelos, bajo la dirección de los Drs. D. Jaime Villaverde Capellán, D^a Esmeralda Morillo González y D^a Leonila Laiz Trobajo, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

Para que conste y a petición de la interesada, firma el presente en Sevilla, Octubre de 2014.

El trabajo de investigación que ha dado lugar a la presente memoria se ha realizado durante el periodo de disfrute de una beca JAE-PreDoc en el marco del Programa “Junta de Ampliación de Estudios” (JAEP-2010), asociada a un Proyecto del Ministerio de Ciencia e Innovación (CTM2009-07335) cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), cuyo título es *“Envejecimiento y biodisponibilidad de residuos de plaguicidas en suelos contaminados y su modelización”*.



JAIME VILLAVERDE CAPELLÁN, Doctor en Farmacia y Científico Titular del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla del Consejo Superior de Investigaciones Científicas; ESMERALDA MORILLO GONZÁLEZ, Doctora en Ciencias Químicas e Investigadora Científica del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla del Consejo Superior de Investigaciones Científicas; y LEONILA LAIZ TROBAJO, Doctora en Ciencias Biológicas y Científica Titular del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Certifican: Que la presente Memoria de Investigación titulada “EMPLEO DE CICLODEXTRINAS EN LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DIURÓN. ESTIMACIÓN DE SU RIESGO TÓXICO”, presentada por D^a Marina Rubio Bellido para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, ha sido realizado bajo su dirección y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Para que conste y a petición de la interesada, firman el presente en Sevilla, Octubre de 2014.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFÍA,
MINERALOGÍA Y QUÍMICA AGRÍCOLA



ISIDORO ÁNGEL GÓMEZ PARRALES, Doctor en Ciencias Químicas y Profesor Titular del Dpto. de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola de la Universidad de Sevilla

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “EMPLEO DE CICLODEXTRINAS EN LA BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR DIURÓN. ESTIMACIÓN DE SU RIESGO TÓXICO”, presentada por D^a Marina Rubio Bellido para optar al título de Doctor por la Universidad de Sevilla, está bajo su tutela y reúne los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Para que conste y a petición de la interesada, firma el presente en Sevilla, Octubre de 2014.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas y entidades que han colaborado en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, el Científico Titular D. Jaime Villaverde Capellán, la Investigadora Científica Dña. Esmeralda Morillo González y a la Científica Titular Dña. Leonila Laiz Trobajo, por la magnífica dirección, orientación, seguimiento diario de mi trabajo en el laboratorio y la supervisión continua del mismo, así como por su comprensión, paciencia, enorme dedicación, sus acertados consejos, el apoyo recibido durante estos años y por el gran interés mostrado para la lectura de este trabajo. A los tres les agradezco la confianza puesta en mí durante estos cuatro años.

Al Profesor Dr. D. Isidoro Ángel Gómez Parrales, por aceptar la Tutoría de la presente Memoria.

A la profesora de Investigación Dña. Celia Maqueda Porras y al Científico Titular D. Tomás Undabeytia López, por los buenos y valiosos consejos expresados durante la realización de esta Tesis.

También quisiera agradecer de forma muy especial a la Dra. Rosa Posada Baquero, a la Dra. M^a Antonia Sánchez Trujillo y al Dr. Fernando Madrid Díaz por el cariño mostrado hacia mí desde el primer momento, por sus sabios consejos y por haber tenido la oportunidad de aprender de ellos.

A la Dirección del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) y a la beca predoctoral (JAE-PreDoc2010) por las facilidades prestadas para la realización de este trabajo. Y a todo el personal del IRNAS por la ayuda recibida cuando la he necesitado y con los que he compartido muchos momentos agradables. También, al servicio de análisis del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS) por las determinaciones analíticas de las muestras de suelo.

Al profesor de Investigación D. Cesáreo Saíz Jiménez y a la Dra. Valme Jurado Lobo, por sus valiosas sugerencias y por permitirme el uso de sus laboratorios para los estudios de Microbiología y Biología Molecular de la presente Memoria.

Al Investigador Científico D. José Julio Ortega Calvo por autorizarme para el manejo habitual del Contador de centelleo.

A la Dra. Beatriz Lucía Cubero García (Científico Titular) por la ayuda prestada en los estudios de Microscopía.

Al Dr. Sebastian Sorensen y a su equipo del Centro de Investigación GEUS (Geological Survey of Denmark and Greenland), por su ayuda y gentileza durante mi estancia en Copenhague (Dinamarca).

Por supuesto, no puedo olvidar los 6 meses trabajados en el laboratorio *Tecfarmade*, actualmente *Itfarmade*, situado entonces en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla. Gracias a esta experiencia tuve la suerte de conocer más cercanamente al Profesor Titular D. José Ramón Moyano Méndez y al profesor Doctor D. José Ignacio Pérez Martínez quienes me informaron y me dieron la oportunidad de conocer a mi actual grupo de investigación.

A mis compañeras de laboratorio: Miriam, Carmen, Irene, Eulalia, Inés, José Luis y Laura, por la ayuda prestada cuando la he necesitado, por su amistad y por los buenos momentos, y en ocasiones también difíciles, que hemos compartido. Os deseo lo mejor en todo lo que os propongáis.

A las chicas del grupo del profesor de Investigación D. Cesáreo Saíz Jiménez: Irene, Isa, Marta, Sara y Ángela por la amabilidad de todas cada vez que he trabajado en sus laboratorios.

A mis grandes amigas, Laura, Ana, Rosario, Leticia, Toñi, Valle y Fátima en primer lugar, por estar siempre a mi lado y en segundo lugar, por demostrarme ánimo, apoyo y cariño continuamente. Gracias chicas por las buenas experiencias vividas, por las que nos quedan, por la amistad que nos une y, por ser como sois.

Con muchísimo cariño muestro mi agradecimiento al mayor tesoro que tengo: mi familia, especialmente a mis padres, Manolo y Mame, por la confianza plena que tienen en mí, y por ofrecerme todo lo que tengo en la vida. Muchas gracias por estar siempre a mi lado, sois mi ejemplo a seguir. También en la misma línea de cariño, a mi hermano Carlos y a mi cuñada María por entenderme, aconsejarme y permanecer cerca de mi vida. Y, en general, a todos mis familiares que, de una forma u otra, me han apoyado en la distancia: mis abuelos/as, tíos/as (especialmente mi tío Fernando), primos/as y allegados.

A mi segunda familia, en especial a mis suegros, Reyes y Jose, y a mi cuñada M^a Teresa, por ser tan buenas personas y brindarme ese cariño tan especial desde el primer día.

Y muy especialmente a Jose, por animarme y apoyarme incondicionalmente cada segundo, por saber escucharme, por sus gratos consejos tanto en la vida como en este trabajo, por ser paciente y compartir conmigo día a día la ilusión de la finalización de esta Tesis. Gracias por estar siempre junto a mí demostrándome tu mejor sonrisa. Gracias por ser como eres.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ABREVIATURAS.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. PLAGUICIDAS.....	3
1.1.1. Herbicidas.....	5
1.1.2. Clasificación de los herbicidas.....	6
1.1.3. Propiedades de los herbicidas.....	8
1.1.4. Herbicida Diurón.....	10
1.2. COMPORTAMIENTO DE LOS HERBICIDAS EN EL SUELO.....	13
1.2.1. Origen de los herbicidas en el suelo.....	13
1.2.2. Evolución de los herbicidas en el suelo.....	13
1.2.3. Adsorción-desorción de los herbicidas en el suelo.....	16
1.2.4. Movilidad de los herbicidas en el suelo.....	23
1.2.5. Biodegradación y mineralización de contaminantes orgánicos.....	24
1.2.6. Biodisponibilidad, bioaccesibilidad y envejecimiento.....	28
1.3. RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS	30
1.3.1. Problemática medioambiental derivada del uso de plaguicidas.....	30
1.3.2. Definición de suelo contaminado.....	32
1.3.3. Técnicas de recuperación de suelos contaminados.....	33
1.3.3.1. Tratamientos térmicos.....	33
1.3.3.2. Tratamientos físico-químicos.....	33
1.3.3.3. Tratamientos biológicos.....	34
1.3.4. Estimación del riesgo tóxico.....	39
1.4. CICLODEXTRINAS.....	41
1.4.1. Definición, obtención y estructura química.....	41
1.4.2. Complejos de inclusión con ciclodextrinas.....	42
1.4.2.1. Concepto.....	42
1.4.2.2. Requerimientos para la formación de complejos de inclusión.....	43
1.4.2.3. Métodos de estudio de complejos de inclusión en solución.....	45
1.4.2.4. Recuperación de suelos contaminados por plaguicidas mediante la aplicación de ciclodextrinas.....	48

2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	57
3.1. MATERIALES.....	57
3.1.1. Herbicida y metabolito.....	57
3.1.2. Componentes coloidales.....	57
3.1.3. Suelos.....	57
3.1.4. Ciclodextrinas.....	59
3.1.5. Enmiendas orgánicas.....	59
3.1.6. Cepas bacterianas.....	61
3.1.7. Planta.....	62
3.2. MÉTODOS.....	62
3.2.1. Determinaciones analíticas para la caracterización de los suelos.....	62
3.2.2. Análisis del herbicida Diurón y su metabolito 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA).....	64
3.2.3. Ensayos de solubilidad de Diurón en presencia de ciclodextrinas.....	65
3.2.4. Estudios de adsorción-desorción de Diurón en componentes coloidales y en suelos.....	66
3.2.5. Estudios de movilidad y biodegradación de Diurón en columnas de suelo.....	67
3.2.6. Estudios de biodegradación de Diurón en solución.....	70
3.2.7. Estudios de mineralización de Diurón en el sistema suelo-agua.....	73
3.2.7.1. Determinación de supervivencia por microscopía de epifluorescencia.....	78
3.2.8. Técnicas de Biología Molecular.....	78
3.2.8.1. Extracción de ADN de las cepas bacterianas.....	78
3.2.8.2. Identificación de las cepas bacterianas.....	79
3.2.8.3. Extracción y concentración de ADN de los suelos.....	80
3.2.8.4. Amplificación mediante PCR de genes que codifican para enzimas de la ruta metabólica de degradación de Diurón.....	81
3.2.9. Estudios de estimación de riesgo en suelos contaminados por Diurón.....	82
3.2.9.1. Extracciones de Diurón con diferentes extractantes.....	82
3.2.9.2. Estudios de toxicidad para plantas.....	83

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
4.1. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD DE DIURÓN EN PRESENCIA DE DISTINTAS CICLODEXTRINAS.....	87
4.2. ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE DIURÓN EN COMPONENTES COLOIDALES Y EN SUELOS.....	91
4.2.1. Adsorción-desorción de Diurón en componentes coloidales.....	92
4.2.2. Adsorción-desorción de Diurón en suelos. Efecto de la adición de HPBCD.....	94
4.2.2.1. Isotermas de adsorción de Diurón.....	94
4.2.2.2. Isotermas de desorción de Diurón.....	100
4.3. LIXIVIACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE DIURÓN EN SUELOS. EFECTO DE LA ADICIÓN DE HPBCD.....	104
4.4. BIODEGRADACIÓN Y MINERALIZACIÓN DE DIURÓN EN SOLUCIÓN.....	111
4.4.1. Biodegradación de Diurón y formación de su metabolito 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA).....	112
4.4.2. Mineralización de Diurón con cepas bacterianas degradadoras específicas.....	117
4.4.3. Caracterización molecular de las cepas bacterianas degradadoras específicas.....	123
4.4.4. Mineralización de Diurón con consorcios degradadores específicos procedentes de los suelos estudiados.....	126
4.5. MINERALIZACIÓN DE DIURÓN EN SUELOS ESTÉRILES CON CEPAS BACTERIANAS DEGRADADORAS ESPECÍFICAS. EFECTO DE LA ADICIÓN DE HPBCD.....	130
4.6. BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS POR DIURÓN. ATENUACIÓN NATURAL ASISTIDA (ANA).....	135
4.6.1. Experimentos con suelos en suspensión.....	135
4.6.1.1. Atenuación natural asistida (ANA). Bioestimulación con nutrientes.....	135
4.6.1.2. Atenuación natural asistida por la aplicación de HPBCD.....	141
4.6.1.3. Bioaumentación con el consorcio bacteriano formado por las 3 cepas degradadoras específicas de Diurón.....	144
4.6.1.4. Tratamiento mixto. Bioestimulación y bioaumentación en suelos contaminados con Diurón.....	147
4.6.1.5. Adición de enmiendas orgánicas al suelo CRF contaminado con Diurón. Efecto de la aplicación de HPBCD.....	149
4.6.2. Experimentos con suelos en estático. Aproximación a un escenario real.....	157
4.7. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE DIURÓN EN SUELOS CONTAMINADOS Y ENVEJECIDOS.....	161
4.7.1. Efecto del envejecimiento en la mineralización de Diurón en suelos seleccionados.....	162

4.7.2. Efecto del envejecimiento en la extracción de Diurón con 3 extractantes no exhaustivos en los suelos seleccionados.....	168
4.7.3. Evaluación de la biodisponibilidad de Diurón envejecido y estimación de la biorrecuperación de suelos contaminados.....	171
4.8. ESTIMACIÓN DEL RIESGO TÓXICO DE DIURÓN ENVEJECIDO EN SUELOS CONTAMINADOS.....	177
4.8.1. Ensayos de ecotoxicidad en plantas.....	177
4.8.2. Estimación del riesgo tóxico para cebada en presencia de Diurón envejecido en suelos.....	182
4.8.3. Efecto del exudado de la cebada sobre la biodisponibilidad de Diurón.....	188
5. CONCLUSIONES.....	193
6. BIBLIOGRAFÍA.....	201
7. PUBLICACIONES.....	235

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1.1. Principales grupos según Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas.....	5
Tabla 1.2. Propiedades de las ciclodextrinas naturales.....	42

Materiales y Métodos

Tabla 2.1. Propiedades físico-químicas de los suelos empleados.....	58
Tabla 2.2. Solubilidad acuosa (g L^{-1}) y pesos moleculares de las distintas CDs empleadas.....	59
Tabla 2.3. Parámetros de las dos enmiendas usadas en este estudio.....	60
Tabla 2.4. Condiciones empleadas en el análisis del herbicida Diurón y su principal metabolito (3,4-DCA).....	64
Tabla 2.5. Solución de nutrientes (SNs).....	69
Tabla 2.6. Composición (g L^{-1}) de los medios de cultivo utilizados en este trabajo.....	71
Tabla 2.7. Ensayos de biodegradación de Diurón con las cepas bacterianas en solución y en dinámico.....	72
Tabla 2.8. Ensayos de mineralización de Diurón con las cepas bacterianas en solución y en dinámico.....	74
Tabla 2.9. Ensayos de mineralización de Diurón con los consorcios bacterianos en solución y en dinámico.....	74
Tabla 2.10. Ensayos de mineralización de Diurón en suspensión: A.1.) Condiciones de esterilidad. A.2.) Condiciones no estériles. Ensayos de mineralización de Diurón en estático, aproximación a un sistema real: B)	76
Tabla 2.11. Primers empleados en las reacciones de amplificación por PCR y secuenciación del gen ribosómico 16S.....	80
Tabla 2.12. Primers empleados en las reacciones de amplificación por PCR de genes degradadores específicos de Diurón.....	82

Resultados y Discusión

Tabla 4.1. Constantes de complejación (K_C , M^{-1}), eficacia solubilizante (S_e), y coeficientes de correlación (R^2) obtenidos a partir de los ensayos de solubilidad para los complejos de inclusión de Diurón en solución y en presencia de GCD, BCD, HPGCD, HPBCD y RAMEB.....	88
Tabla 4.2. Energía libre de enlace y la superficie de contacto en los complejos de inclusión formados entre las diferentes CDs y la molécula de Diurón según el modelo de complejación incluido en "Cyclodextrin KnowledgeBase".....	90
Tabla 4.3. Cantidad de Diurón adsorbido y porcentaje de Diurón desorbido frente a 2 componentes coloidales estudiados: AH y M.....	93
Tabla 4.4. Parámetros de la ecuación de Freundlich (K_f y n), coeficientes de correlación (R^2) y K_f normalizada con el contenido de carbono orgánico (K_{fOC}) correspondientes a la adsorción de Diurón sobre los distintos suelos empleados.....	95

Tabla 4.5. Contenido en óxidos amorfos de Fe, Mn y Al de los suelos estudiados (g Kg^{-1}).....	97
Tabla 4.6. Coeficientes de correlación entre diferentes propiedades de los suelos (MO, fracción arcilla, CO_3^{-2} , K_f , Fe_2O_3 , Al_2O_3 y MnO amorfos): a) Todos los suelos estudiados; b) Excepto los suelos LM y AL.....	98
Tabla 4.7. Porcentaje de Diurón desorbido de los suelos estudiados con una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y una solución de HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida aplicada (10 mg L^{-1}) equivalente a 570 mg L^{-1} de HPBCD.....	102
Tabla 4.8. Correlaciones estadísticas entre diferentes propiedades de los suelos (MO, fracción arcilla, Fe_2O_3 , Al_2O_3 y MnO), K_f y los porcentajes desorbidos con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y con HPBCD (10 veces la concentración molar del herbicida) a una concentración inicial de Diurón añadido de 10 mg L^{-1}	104
Tabla 4.9. Porcentaje de Diurón eluido y extraído de las columnas de suelo a distintas profundidades, en presencia o no de HPBCD x10.....	108
Tabla 4.10. Parámetros cinéticos a partir de las curvas de biodegradación de Diurón en solución, tras la inoculación con <i>A. sulfonivorans</i> , <i>A. kashmirensis</i> y <i>V. soli</i>	114
Tabla 4.11. Parámetros cinéticos a partir de las curvas de mineralización de Diurón en solución tras la inoculación de <i>A. sulfonivorans</i> , <i>A. kashmirensis</i> y <i>V. soli</i>	119
Tabla 4.12. Porcentaje del consorcio bacteriano no viable observado en el microscopio de epifluorescencia y el número de células totales a diferentes tiempos.....	121
Tabla 4.13. Genes específicos degradadores de Diurón analizados en PCR para las 3 cepas bacterianas (<i>A. sulfonivorans</i> , <i>A. kashmirensis</i> y <i>V. soli</i>).....	124
Tabla 4.14. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de las curvas de mineralización de Diurón en presencia de los 5 consorcios estudiados (C1, C2, C3, C4 y C5).....	128
Tabla 4.15. Parámetros obtenidos en la mineralización de Diurón en los 10 suelos con las cepas bacterianas formando un consorcio y en presencia de HPBCD x10.....	132
Tabla 4.16. Estudio en placas con R2A diluido 40 veces con y sin la adición de Diurón y HPBCD x10.....	134
Tabla 4.17. Parámetros cinéticos calculados a partir de las mineralizaciones de Diurón por la flora endógena en presencia de SNs en los suelos estudiados, y las UFC (unidades formadoras de colonias) potenciales específicas degradadoras de Diurón.....	137
Tabla 4.18. Cantidad de ADN de los suelos estudiados y detección de fragmentos de genes que codifican la síntesis de enzimas de la ruta de degradación de Diurón.....	139
Tabla 4.19. Parámetros cinéticos (K_1 , K_2 , t_b , fase lag y DT_{50}) obtenidos a partir de las mineralizaciones de Diurón en los 10 suelos y sometidos a 4 tratamientos diferentes.....	143
Tabla 4.20. Datos obtenidos a partir de las mineralizaciones de Diurón en el suelo CRF dopado con 50 mg kg^{-1} y en presencia de 2 enmiendas orgánicas (RSU y LDA), y en ausencia y en presencia de HPBCD.....	151

Tabla 4.21. <i>Parámetros cinéticos de las mineralizaciones de Diurón en el suelo AL dopados con 50 mg kg⁻¹ en 4 tratamientos diferentes en estático.....</i>	158
Tabla 4.22. <i>Parámetros cinéticos de las mineralizaciones de Diurón en el suelo AL dopados con 50 mg kg⁻¹ en 3 tratamientos diferentes en estático.....</i>	160
Tabla 4.23a. <i>Parámetros obtenidos a partir de la mineralización de Diurón en los suelos CR, CRF, VG, LM y PLS envejecidos a diferentes tiempos e inoculados con el consorcio bacteriano obtenido en la presente memoria.....</i>	165
Tabla 4.23b. <i>Parámetros obtenidos a partir de la mineralización de Diurón en los suelos PLD, TM, P44, AL y FH envejecidos a diferentes tiempos e inoculados con el consorcio bacteriano obtenido en la presente memoria.....</i>	166
Tabla 4.24. <i>Porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl₂ y porcentaje de Diurón mineralizado a diferentes tiempos de envejecimiento en los 10 suelos. Concentración inicial de Diurón 50 mg kg⁻¹.....</i>	175
Tabla 4.25. <i>Porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl₂ y porcentaje de inhibición del peso de la zona aérea de la planta a diferentes tiempos de envejecimiento en los 10 suelos estudiados. Concentración inicial de Diurón 5 mg kg⁻¹.....</i>	181
Tabla 4.26. <i>Porcentaje de Diurón extraído con el exudado de la cebada y porcentaje inhibido del peso de la parte aérea de la cebada a diferentes tiempos de envejecimiento en los suelos CRF, PLD, AL y FH.....</i>	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1.1. Porcentaje de las principales categorías de fitosanitarios consumidos a nivel nacional en el año 2012.....	4
Figura 1.2. Principales categorías de sustancias químicas según Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de herbicidas.....	5
Figura 1.3. Fórmula estructural del herbicida Diurón.....	10
Figura 1.4. Estructura del metabolito 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA).....	12
Figura 1.5. Dinámica de los herbicidas en el sistema suelo-agua-atmósfera.....	14
Figura 1.6. Esquema del proceso biodegradación-mineralización.....	25
Figura 1.7. Concepto de biodisponibilidad y bioaccesibilidad de un contaminante en suelo mostrado de manera esquemática.....	29
Figura 1.8. Esquema de biorrecuperación asistida.....	37
Figura 1.9. Esquema de la formación de un compuesto de inclusión con CD.....	43
Figura 1.10. Representación de los distintos tipos de diagramas de solubilidad existentes (S_c : solubilidad límite del complejo poco soluble. S_o : solubilidad de la molécula huésped).....	46

Materiales y Métodos

Figura 2.1. Cepas bacterianas cultivadas. A: <i>Advenella</i> sp. SLODRJ-01; B: <i>Arthrobacter</i> sp. N23; C: <i>Variovorax</i> sp. SRS16.....	61
Figura 2.2. Columna de suelo utilizada en los estudios de movilidad de Diurón.....	68
Figura 2.3. Respirómetro empleado para los estudios de mineralización de Diurón y trampa de álcali antes de ser incorporada al matraz erlenmeyer.....	73

Resultados y Discusión

Figura 4.1. Diagramas de solubilidad de Diurón en presencia de las CDs naturales (BCD y GCD) y de las CDs sintéticas (RAMEB, HPBCD y HPGCD).....	88
Figura 4.2. Estructuras más estables de los complejos de Diurón con cada una de las CDs investigadas (GCD, HPGCD, BCD, HPBCD y RAMEB) obtenidas a partir del modelo de complejación incluido en "Cyclodextrin KnowledgeBase".....	90
Figura 4.3. Isotermas de adsorción de Diurón en los distintos componentes coloidales.....	92
Figura 4.4. Isotermas de adsorción de Diurón en los suelos estudiados.....	94
Figura 4.5. Isotermas de adsorción-desorción de Diurón empleando solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y una solución de HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida (10 mg L^{-1}) en los suelos estudiados.....	101

Figura 4.6. Porcentajes de Diurón desorbido cuando se empleó como solución extractante HPBCD a concentraciones de 0, 10, 100, 500 y 1000 veces la concentración molar del herbicida Diurón (5 mg kg^{-1}).....	102
Figura 4.7. Columnas de los suelos FH y CR para el estudio de lixiviación de Diurón en presencia y ausencia de HPBCD.....	105
Figura 4.8. Curvas de elución de Diurón en los suelos FH y CR con y sin HPBCD, y agua destilada como eluyente.....	107
Figura 4.9. Curvas de elución acumulativa de Diurón en columnas de los suelos FH y CR.....	108
Figura 4.10. Curvas de biodegradación de Diurón en los dos primeros segmentos de las columnas del suelo FH, en presencia y no de HPBCD x10 a diferentes tiempos de envejecimiento.....	111
Figura 4.11. Curvas de crecimiento de las cepas <i>A. sulfonivorans</i> , <i>A. kashmirensis</i> , y <i>V. soli</i>	113
Figura 4.12. Curvas de biodegradación de Diurón en solución (línea continua) y formación del principal metabolito 3,4-DCA (línea discontinua) en presencia de diferentes cepas bacterianas. Inoculación de cepas bacterianas individuales: <i>A. sulfonivorans</i> (1), <i>V. soli</i> (2), <i>A. kashmirensis</i> (3); inoculación por parejas bacterianas: <i>A. sulfonivorans</i> + <i>V. soli</i> (4), <i>A. kashmirensis</i> + <i>A. sulfonivorans</i> (5), <i>A. kashmirensis</i> + <i>V. soli</i> (6); inoculación del consorcio bacteriano <i>A. sulfonivorans</i> + <i>A. kashmirensis</i> + <i>V. soli</i> (7).....	115
Figura 4.13. Curvas de mineralización de Diurón en medio MSM inoculado con las cepas bacterianas <i>A. sulfonivorans</i> , <i>A. kashmirensis</i> y <i>V. soli</i>	118
Figura 4.14. Fotos del consorcio degradador de Diurón obtenidas por microscopía de epifluorescencia. A) Bacterias vivas, B) Bacterias muertas.....	121
Figura 4.15. Vía de biodegradación y/o mineralización de Diurón mediante las 3 cepas bacterianas degradadoras específicas estudiadas.....	122
Figura 4.16. Ruta catabólica de la degradación de Diurón en presencia de las cepas bacterianas, <i>A. sulfonivorans</i> , <i>A. kashmirensis</i> y <i>V. soli</i> a través de los genes catabólicos específicos <i>Lib A</i> , <i>dcaQ</i> y <i>ccdC</i> . Esquema basado en la ruta catabólica de degradación de linurón en el estudio de Bers y col. (2011).....	125
Figura 4.17. Curvas de crecimiento de los consorcios C1, C2, C3, C4 y C5 en medio LB y en presencia de Diurón (40 mg L^{-1}).....	127
Figura 4.18. Curvas de mineralización de Diurón en medio MSM inoculado con los consorcios C1, C2, C3, C4 y C5.....	128
Figura 4.19. Curvas de mineralización de Diurón en 10 suelos estériles inoculados con las 3 cepas degradadoras específicas de Diurón formando un consorcio bacteriano (línea continua), y en presencia de HPBCD x10 (línea discontinua).....	131
Figura 4.20. a) y b). Curvas de mineralización de Diurón (50 mg kg^{-1}) en presencia de la solución de nutrientes (SNs) en los suelos: a) CR, CRF, VG, LM y PLS y b) PLD, TM, P44, AL y FH.....	136
Figura 4.21. Curvas de mineralización de Diurón comparando 2 tratamientos basados en la atenuación natural asistida por: solución de nutrientes (SNs) (Tratamiento 23) y SNs + HPBCD x10 (Tratamiento 24).....	142

Figura 4.22. Curvas de mineralización de Diurón. Biestimulación (SNs) y bioaumentación con los degradadores específicos de este herbicida.....	145
Figura 4.23. Curvas de mineralización de Diurón. Tratamiento mixto.....	148
Figura 4.24. Curvas de mineralización del herbicida Diurón en el suelo CRF en presencia de nutrientes (SNs) (●) y la posterior adición de: a) compost LDA y b) compost RSU aplicados a diferentes concentraciones (0,5% (◆), 2% (■) y 4% (▲))...	150
Figura 4.25. Porcentaje de Diurón extraído en el suelo CRF en presencia de la SNs, y/o las dos enmiendas, LDA y RSU al 4% con y sin HPBCD x10.....	152
Figura 4.26. Curvas de mineralización del herbicida Diurón en el suelo CRF en presencia de las dos enmiendas orgánicas: a) SNs y 4% LDA (▲); SNs y la adición de HPBCD (◆); SNs, 4% LDA y la adición de HPBCD (■). b) SNs y 4% RSU (▲); SNs y la adición de HPBCD (◆); SNs, 4% RSU y la adición de HPBCD (■).....	154
Figura 4.27. Curvas de mineralización de Diurón en el suelo AL en condiciones estáticas al 40% de la capacidad de campo tras 4 tratamientos diferentes.....	158
Figura 4.28. Curvas de mineralización de Diurón en el suelo AL en condiciones estáticas al 40% de la capacidad de campo tras 3 tratamientos diferentes.....	160
Figura 4.29. Efecto del envejecimiento en la mineralización de Diurón en 10 suelos inoculados con el consorcio bacteriano degradador específico de Diurón obtenido en la presente memoria.....	164
Figura 4.30. Porcentajes de Diurón extraído cuando se empleó como solución extractante HPBCD a concentraciones de 0, 10, 100, 500 y 1000 veces la concentración molar del herbicida Diurón (50 mg kg ⁻¹).....	168
Figura 4.31. Porcentaje de Diurón extraído empleando 3 extractantes no exhaustivos, butanol, solución de CaCl ₂ y HPBCD x10, en los 10 suelos estudiados y contaminados a una concentración de 50 mg kg ⁻¹ , después de 0, 15, 30, 60 y 100 días de envejecimiento.....	170
Figura 4.32a. Correlación entre el porcentaje de Diurón mineralizado y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl ₂ para los suelos CR, CRF, VG, LM y PLS después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (x), 60 (*) y 100 (●) días.....	173
Figura 4.32b. Correlación entre el porcentaje de Diurón mineralizado y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl ₂ para los suelos PLD, TM, P44, AL y FH después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (x), 60 (*) y 100 (●) días.....	174
Figura 4.33. Correlación lineal global entre el porcentaje medio extraído y el porcentaje medio mineralizado en 10 suelos a diferentes tiempos de envejecimiento para cada extractante empleado.....	176
Figura 4.34. Porcentaje de inhibición del peso de la parte aérea de la planta, talla y número de semillas que germinan en los 10 suelos previamente contaminados con Diurón (5 mg kg ⁻¹) y dejados envejecer durante 0, 15, 30, 60 y 100 días.....	178
Figura 4.35. Porcentaje de inhibición del peso de la parte aérea de la planta estudiada en los 10 suelos previamente contaminados con Diurón (5 mg kg ⁻¹) y dejados envejecer durante 0, 15, 30, 60 y 100 días.....	180

Figura 4.36. Porcentaje de Diurón extraído a partir de 3 extracciones no exhaustivas con butanol, solución de CaCl_2 y HPBCD x10, en los 10 suelos estudiados y contaminados a 5 mg kg^{-1} , después de 0, 15, 30, 60 y 100 días de envejecimiento.....	183
Figura 4.37a. Correlación entre el porcentaje de inhibición del peso de la cebada y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD x10 y CaCl_2 para los suelos CR, CRF, VG, LM y PLS después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (x), 60 (*) y 100 (●) días.....	185
Figura 4.37b. Correlación entre el porcentaje de inhibición del peso de la cebada y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD x10 y CaCl_2 para los suelos PLD, TM, P44, AL y FH después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (x), 60 (*) y 100 (●) días.....	186
Figura 4.38. Correlación lineal global entre el porcentaje medio extraído y el porcentaje medio de inhibición del peso de la parte aérea de la cebada a diferentes tiempos de envejecimiento para cada extractante empleado.....	187
Figura 4.39. Porcentaje de Diurón extraído con el exudado de las raíces de la planta (cebada), en los suelos CRF, PLD, AL y FH, contaminados a 5 mg kg^{-1} después de 0, 15, 30, 60 y 100 días de envejecimiento.....	189

ABREVIATURAS

3,4-DCA	3,4-dicloroanilina
AH	Ácido húmico sintético
BCD	β -ciclodextrina
C1	Consorcio de microorganismos aislado del suelo CRF
C2	Consorcio de microorganismos aislado del suelo PLD
C3	Consorcio de microorganismos aislado del suelo PLS
C4	Consorcio de microorganismos aislado del suelo FH
C5	Consorcio de microorganismos aislado del suelo AL
CCC	Capacidad de cambio catiónico
CD(s)	Ciclodextrina(s)
FOCUS	Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration
GCD	γ -ciclodextrina
GT	Goetita acicular sintética
HPBCD	2-hidroxipropil- β -ciclodextrina
HPGCD	2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HS	Modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick
K₁	Tasa de mineralización hasta la t_b (días ⁻¹)
K₂	Tasa de mineralización después de t_b (días ⁻¹)
LB	Medio Luria –Bertani
LDA	Lodos de depuradora
MHS	cinética de primer orden bifásica Hockey Stick (HS) modificado
MOD	Materia orgánica disuelta
MSM	Medio Mineral salts
pzc	Punto cero de carga
R2A	Medio 830 de la lista de medios para microorganismos (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)
RAMEB	β -ciclodextrina metilada aleatoriamente
rpm	Revoluciones por minutos
RSU	Residuos sólidos urbanos
SFO	Modelo cinético simple de primer orden
SNs	Solución de nutrientes
SW	Montmorillonita
tb	Tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días)
UFC	Unidades formadoras de colonias

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PLAGUICIDAS

La denominación de *plaguicidas* incluye una amplia variedad de productos muy diferentes en su composición y propiedades a pesar de su utilización común. Para los fines del *Codex Alimentarius* (Comisión creada en 1963 por la Food and Agricultural Organization, FAO, y la Organización Mundial de la Salud, OMS o WHO, World Health Organization, pertenecientes a la ONU), se entiende por plaguicida o pesticida *“cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción y/o almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos”*.

Los plaguicidas tienen diversos usos:

- ◆ Plaguicidas de uso fitosanitario o productos fitosanitarios, destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal, para combatir malezas u otros organismos indeseables.
- ◆ Plaguicidas de uso ganadero, destinados a su utilización en el entorno de los animales o en las actividades estrechamente relacionadas con su explotación.
- ◆ Plaguicidas para uso en la industria alimentaria, utilizados en tratamientos externos de transformación de vegetales, de productos de origen animal y de sus envases, así como los destinados al tratamiento de locales, instalaciones o maquinarias relacionadas con la industria alimentaria.
- ◆ Plaguicidas de uso ambiental, empleados en operaciones de desinfección, desinsectación y desratización en locales públicos o privados, establecimientos fijos o móviles, medios de transporte e instalaciones.
- ◆ Plaguicidas para uso en higiene personal, aquellos preparados que se pueden aplicar directamente sobre el hombre.
- ◆ Plaguicidas para uso doméstico, cualquiera de los definidos anteriormente, autorizados expresamente para que puedan ser aplicados por personas no especialmente cualificadas en viviendas y otros locales habitados.

Para que un plaguicida sea aceptable para su uso como tal, debe reunir las siguientes cualidades:

- Efectividad en la destrucción de la plaga contra la que se aplica.
- Selectividad en su acción sobre su objetivo, en cuyo caso no puede perjudicar la flora o fauna beneficiosa.

- Economía, proporcionando mayores beneficios que los gastos que ocasiona su uso.
- Seguridad, no suponer un peligro para la salud del ser humano.
- Estabilidad durante el tiempo necesario para el desarrollo de su acción.
- Posibilidad de formulación a los efectos de aplicabilidad, estabilidad y efectividad.
- Anillos saturados o los alcanos muy ramificados.

Por segundo año el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente lleva a cabo la Estadística de Comercialización de Productos Fitosanitarios a través de la “encuesta de comercialización de Productos Fitosanitarios”, encuesta que se basa en el conocimiento de las sustancias activas comercializadas dentro del marco nacional por las empresas titulares de dichos productos. A continuación en la Figura 1.1 se muestran las principales clasificaciones realizadas por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente relativo a las estadísticas de fitosanitarios.

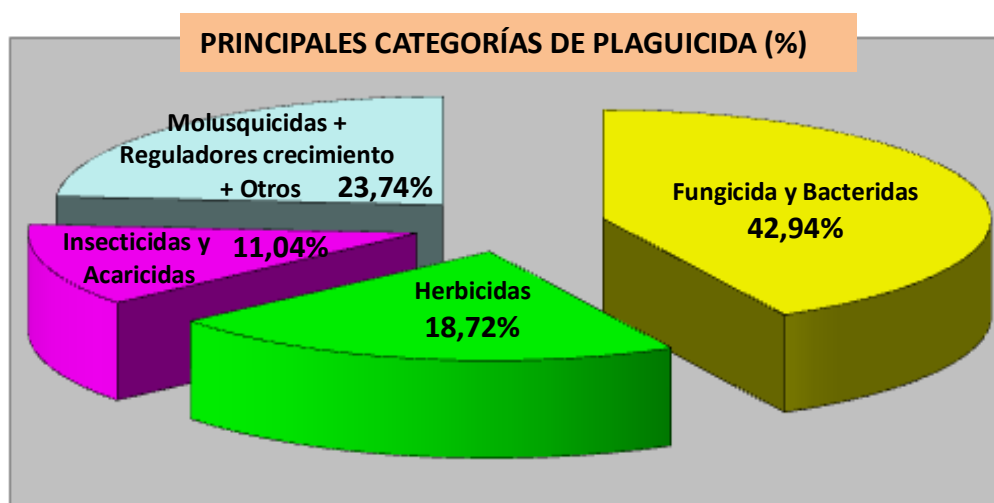


Figura 1.1. Porcentaje de las principales categorías de fitosanitarios consumidos a nivel nacional en el año 2012.

La Estadística de Comercialización de Productos Fitosanitarios es considerada una herramienta fundamental dentro del Plan de Acción Nacional para el uso sostenible de productos Fitosanitarios (PAN) desarrollado de acuerdo al Real Decreto 1311/2012, 4 de Septiembre, que establece el marco político para alcanzar un uso sostenible y transpone el ordenamiento jurídico interno Directiva 2009/128/CEE, 21 de Octubre de 2009 la acción comunitaria para un uso sostenible de plaguicidas. Estos porcentajes corresponden a las siguientes cantidades expresadas en toneladas.

Las clasificaciones que se muestran en la Tabla 1.1 han sido realizadas según Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas.

Tabla 1.1. Principales grupos según Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas.

Principales Categorías de plaguicidas	Toneladas
Fungicidas y Bactericidas	25540
Herbicidas	13626
Insecticidas y Acaricidas	7706
Molusquicidas, Reguladores de Crecimiento y Otros	14899

Dentro del grupo de los herbicidas se han recogido las principales categorías de sustancias químicas comercializadas durante el año 2012.

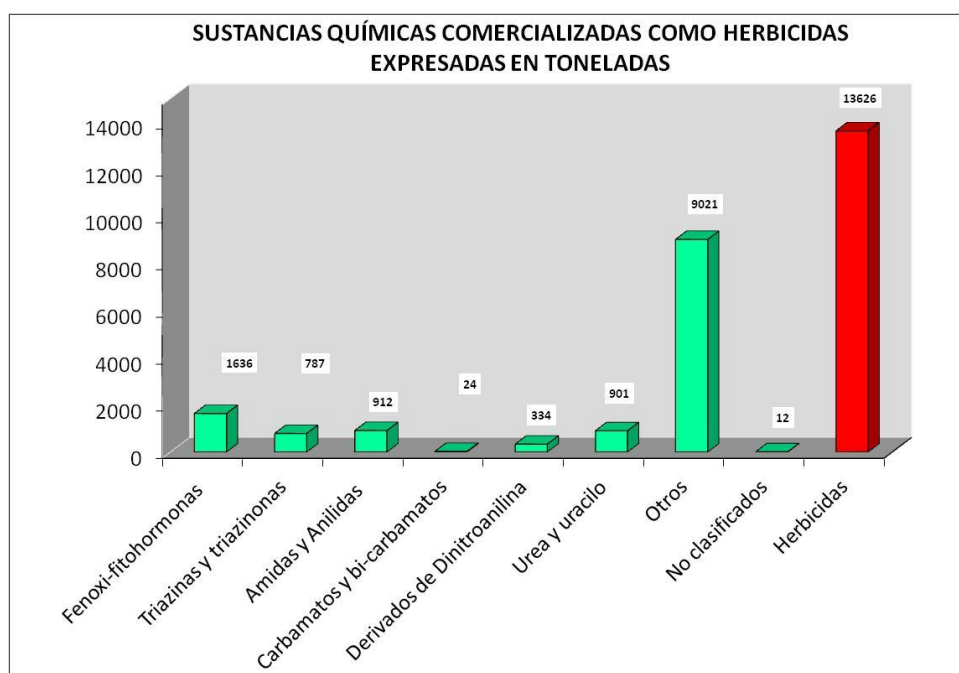


Figura 1.2. Principales categorías de sustancias químicas según Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de Noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de herbicidas.

Dado que esta Memoria se centra en el estudio de un determinado herbicida, el herbicida Diurón, se procederá a hacer una breve introducción de éstos.

1.1.1. Herbicidas

Los *herbicidas* son sustancias que inhiben parcial o totalmente a las *malas hierbas o malezas*, conociéndose éstas como aquellas plantas que crecen siempre o de forma predominante y que no resultan deseables por el hombre en un lugar y momento determinado.

Existe una competición activa entre la planta cultivada y las malas hierbas, ya que éstas impiden o dificultan el aprovechamiento de los nutrientes, el agua, la luz o el espacio útil por parte de las plantas cultivadas. Las malas hierbas tienen, en general, un crecimiento rápido y vigoroso, absorben una parte de abonos aportados al suelo y, en particular, los nitratos. También absorben

una cantidad importante de agua del suelo, siendo ésta un factor importante en la producción del vegetal cultivado ya que transporta en su interior las materias minerales absorbidas por las raíces. La reducción de esta circulación retrasa el transporte de materias nutritivas, comprobándose una reducción en la asimilación clorofílica y de la producción de materias de síntesis y, por consiguiente, un retraso en el desarrollo de la planta cultivada.

Las causas del desarrollo de los herbicidas hay que buscarlas en el impresionante aumento demográfico que ha sufrido la Tierra y, por tanto, de la demanda de alimentos, por lo que se ha planteado la escarda de los cultivos para aumentar la producción. El desarrollo de hierbas indeseables junto a los cultivos origina diversos problemas, disminuye la producción, dificulta el laboreo y recolección y hace necesaria la mano de obra o el uso de plaguicidas para su eliminación en todo el mundo. Por ello, las hierbas indeseables limitan la producción agrícola, reducen la calidad de las cosechas, y repercuten considerablemente sobre la economía. Todo ello ha hecho que el uso de los herbicidas se haya impuesto como una de las operaciones más necesarias para conseguir cosechas estables de alto rendimiento, así como para mantener despejados los linderos de las vías férreas, las zonas bajo tendidos eléctricos y para el mantenimiento de cortafuegos libres de vegetación.

La utilización de los herbicidas se basa en el conocimiento profundo de las hierbas a erradicar, y en la selección de las materias activas idóneas para obtener un control económico sin degradar el medio ambiente. Durante cientos de años, el hombre luchó contra las malezas contando sólo con sus manos, o empleó estacas puntiagudas, azadas, fuerza animal y finalmente fuerza mecánica.

La evolución de la lucha química contra plantas adventicias se inició a finales del siglo XIX, al introducirse el sulfato de cobre en cultivo de cereales, disputándose la primacía en la introducción de los tratamientos con productos químicos para eliminar las hierbas perjudiciales en Inglaterra y Estados Unidos. Fue en este último país donde esta técnica llegó a ser rápidamente una práctica usual, y desde allí se fue extendiendo, primero a los países agrícolas de técnica avanzada, y luego por todo el mundo. Desde entonces, el proceso ha sido constante.

El hecho más decisivo, en el desarrollo práctico de los herbicidas, ha sido el descubrimiento en 1941 de las propiedades bioquímicamente selectivas del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que significó el principio de la Malherbología (Labrada y col. 1996; Kudsk y Streibig, 2003).

1.1.2. Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas se clasifican utilizando diversos criterios. Entre otros, aquellos relativos a su estructura química, modo de acción, o métodos de aplicación (García Torres y Fernández-Quintanilla, 1991; Ware y Whitacre, 2004).

Dentro de los modos de acción para su aplicación se dividen según su selectividad en herbicidas *no selectivos o totales*, que son aquellos dirigidos a destruir toda la vegetación presente en la zona de aplicación, y en herbicidas *selectivos*, cuyo objetivo es destruir las malas hierbas presentes en los cultivos, sin afectar a las plantas que interesan.

Según la superficie de suelo tratada encontramos herbicidas de *aplicación extensiva*, que se aplican sobre toda la superficie a tratar. En caso de tratamientos demasiado caros y que las plantas cultivadas se encuentren en líneas suficientemente distanciadas, el herbicida se puede aplicar sólo *sobre las bandas* en que se siembra el cultivo.

El modo de aplicación del herbicida puede ser por *vía foliar* o *a través del suelo*. Por vía foliar, a su vez, se subdividen en herbicidas *de contacto*, que son aquellos que sólo afectan a la parte de la planta con la cual entran en contacto, y en herbicidas de *traslocación o sistémicos* que ejercen su acción en los lugares críticos de la planta, que pueden estar más o menos distantes de la zona de aplicación. Los herbicidas que se aplican *a través del suelo* o también llamados *residuales*, actúan por contacto con las raíces y por traslocación una vez que el herbicida ha penetrado en la planta y se traslada hasta los puntos en los que tiene lugar su acción tóxica. Estos productos, como permanecen en el suelo durante periodos más o menos largos de tiempo, tienen un efecto residual sobre las hierbas que germinan en dicho periodo.

Según el momento de aplicación de los herbicidas, éstos pueden ser de *presiembr*a o *pretrasplante*, cuando el tratamiento se realiza antes de la siembra o trasplante del cultivo; de *preemergencia*, en caso de que el herbicida se aplique después de sembrar la cosecha y antes de su germinación; o bien de *postemergencia* cuando se aplican después de la germinación del cultivo.

Según el modo de moverse en la planta o translocación se clasifican como herbicidas que pueden translocarse a través del xilema (*herbicidas apoplásticos*), floema (*herbicidas simplásticos*), por ambos (*herbicidas de translocación ambivalente o total*) o que no pueden translocarse (*herbicidas de contacto*).

Con frecuencia, los herbicidas se clasifican en grupos o familias de acuerdo con una cierta analogía o similitud en su estructura química. Así, podemos citar los *fenoxiacéticos* (como 2,4-D o MCPA), *cloroacetamidas* (como metocloro), *ácidos benzoicos* (dicamba), *bipiridilos* (paracuat), *imidazolinonas* (imazapir), *piridazinonas* (norflurazona) o *ureas* (diurón), entre otros (Ware y Whitacre, 2004), siendo estas últimas, unos de los contaminantes ambientales más frecuentes (Lapworth y Goody. 2006; Struger y col. 2011).

Actualmente, el desarrollo de los herbicidas se encamina hacia una “selectividad específica” para que sean lo más seguro posible para el cultivo y obtener, a la vez, un amplio espectro de acción. La ampliación de la gama de efectividad se consigue muchas veces uniendo un par de herbicidas. También es frecuente mezclar uno de contacto con otro residual, a fin de que el primero destruya las hierbas presentes y el segundo prevenga reinvasiones y rebrotes. Las combinaciones que se pueden formar en uno u otro caso son innumerables y no tienen otra limitación que la selectividad frente al cultivo.

La utilización constante de un mismo herbicida sobre un cultivo determinado puede conducir, a la larga, a un cambio de la flora adventicia. Al actuar el herbicida sobre las malas hierbas sensibles a él, y no sobre otras, hace que éstas últimas vayan invadiendo el terreno más o menos lentamente, de modo que al cabo de un tiempo, las hierbas dominantes han dejado de tener importancia para ceder su sitio a otras en las que el herbicida usual es menos efectivo. Para resolver el problema debe cambiarse de herbicidas o bien recurrir a mezclas con otros que sean efectivos sobre la nueva flora dominante.

1.1.3. Propiedades de los herbicidas

La persistencia en el suelo de un herbicida está relacionada con sus propiedades, que sirven como primera aproximación para conocer qué procesos están implicados en la disipación del herbicida. Un compuesto persistente es aquel que no se hidroliza o se degrada rápidamente, es poco volátil, poco soluble en agua y, por tanto, tiene poca o ninguna movilidad (Wauchope y col. 2002).

Los compuestos de **estructura** estable son más persistentes. La característica del herbicida que está asociada generalmente con una mayor adsorción es la elevada afinidad de la molécula por la superficie del suelo.

La **volatilidad** se mide a partir de la constante de Henry, que depende de la presión de vapor en estado líquido y de la solubilidad en agua. La adsorción en el suelo es un proceso importante que disminuye la volatilización. Otros factores que influyen en ella son el método de aplicación del herbicida, la temperatura y humedad del suelo, el contenido en materia orgánica del suelo, la textura, la porosidad, la persistencia residual y la lixiviación.

El **coeficiente de reparto octanol-agua (Kow)** mide la hidrofobicidad (o la lipoafinidad) de un compuesto, de tal forma que cuanto menos ionizada es una molécula, más tenderá a ser adsorbida en una superficie hidrofóbica desde una disolución polar. Este coeficiente se ha utilizado como medida de la adsorción de los compuestos no-iónicos al suelo, siendo principalmente adsorbidos por la materia orgánica. Está relacionado con el potencial de

bioacumulación (capacidad de un compuesto para acumularse en organismos vivos). La **solubilidad** en agua está relacionada además de con la temperatura, con la lixiviación, el grado de adsorción, la movilidad en el medio ambiente, la adsorción por las plantas y la persistencia. Es un factor trascendente por dos razones fundamentales: la fase líquida del suelo es una fase acuosa, lo que condiciona la dinámica del herbicida asociado a dicha fase, y los herbicidas con mayor carácter contaminante son poco solubles en agua.

El **coeficiente de Reparto o Adsorción (K_d)**, representa la relación entre la concentración del herbicida adsorbida en el suelo y la concentración del herbicida que queda en la disolución del suelo en condiciones de equilibrio químico. Es el parámetro más sensible para predecir el transporte y el destino de los herbicidas en éste. Está relacionado con la capacidad de adsorción al suelo (Wauchope y col. 2002).

Coeficiente de Reparto Normalizado (K_{oc}), normaliza el coeficiente de adsorción refiriéndolo al contenido en carbono orgánico del suelo, siendo la característica que más influye en la adsorción de las moléculas orgánicas, pudiendo correlacionarse con ésta y no con otras características del suelo. No es apropiado para los herbicidas iónicos, ya que los mecanismos electrostáticos priman en esas circunstancias, siendo el intercambio iónico con las superficies de los minerales de arcillas cargados negativamente el mecanismo de adsorción preferente de estos compuestos.

La adsorción de un compuesto en el suelo es el mayor determinante de su potencial para lixivarse. Gustafson desarrolló un índice de lixiviación basado en la persistencia en el suelo y la adsorción, denominado **Índice de GUS** (*Groun-water Ubiquity Store*), que utiliza la vida media ($t_{1/2}$) y K_{oc} para su cálculo, por lo que es más adecuado para los compuestos no iónicos.

Hay que tener en cuenta, que la vida media de un herbicida no es siempre la misma, varía sobre todo con la temperatura y la humedad, por tanto, un herbicida aplicado en una determinada época del año puede tener diferente coeficiente de GUS que si se aplica en otra época, y por consiguiente, puede ser considerado lixiviable.

Constantes de acidez y basicidad, (pK_a y pK_b), parámetros significativos para los herbicidas que se comportan como ácidos y bases débiles, ya que determinan el rango de pH en que se comportan como especies neutras o ionizadas. La ionización está relacionada con las rutas y mecanismos de adsorción, persistencia e interacción con otras especies moleculares. Depende del pH del suelo, que afecta a la adsorción y a la movilidad. Las especies aniónicas que tienen una carga negativa al pH del suelo suelen ser potencialmente lixiviables.

Por último, la **presentación** del herbicida tiene un marcado efecto sobre su persistencia, según sea en emulsión, polvo, granulada, etc. La más persistente es la granular que además permite la

aplicación del producto, sobre la superficie del suelo sin necesidad de incorporación. Esta práctica aumenta la persistencia de los herbicidas al reducir las pérdidas por volatilización, degradación fotoquímica o ambas.

1.1.4. Herbicida Diurón

A continuación se describen las características del herbicida Diurón, al que se hará referencia a lo largo de la presente Memoria.

El Diurón es un herbicida orgánico hidrófobo que se ha detectado en suelo, aguas subterráneas y sedimentos. El herbicida Diurón pertenece a la familia química de las fenilureas. Su nombre en la IUPAC es 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea, su fórmula empírica es $C_9H_{10}Cl_2N_2O$. Es un polvo blanco, con un peso molecular de 233,1, siendo su fórmula estructural la que se detalla a continuación:

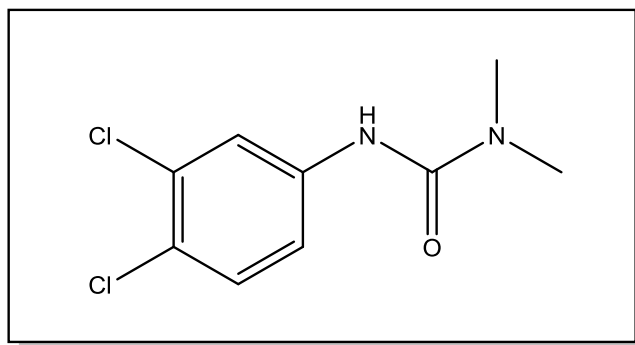


Figura 1.3. Fórmula estructural del herbicida Diurón.

El Diurón es considerado como una de las sustancias más peligrosas descritas por la Comisión Europea (Malato y col. 2003). Por consiguiente, el Diurón ha sido incluido en la lista de sustancias tóxicas prioritarias de la Comisión Europea de Recursos de Agua Dulce (Directiva 2000/60CE) y en la actualidad se encuentra en la tercera lista de candidatos para ser incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de aguas para consumo humano de la Agencia de Protección Medio Ambiental de los Estados Unidos.

♦ Propiedades físicoquímicas

El Diurón es un sólido cristalino blanco, sin olor. Tiene un punto de fusión que se encuentra sobre 158°C - 159°C . Presenta una baja solubilidad en agua, $36,4\text{ mg L}^{-1}$ (25°C), siendo mucho mayor su solubilidad en disolventes orgánicos: acetona 53 g L^{-1} , butil estearato $1,4\text{ g L}^{-1}$ y $1,2\text{ g L}^{-1}$ en benceno, siendo poco soluble en hidrocarburos. Es una molécula estable a temperatura ambiente, pero se hidroliza a elevadas temperaturas. Puede sufrir hidrólisis en medio ácido o básico. Se descompone a $180 - 190^{\circ}\text{C}$. Presenta una presión de vapor de $0,009\text{ mPa}$ a 25°C y una constante de Henry de $0,000051\text{ Pa m}^3\text{ mol}^{-1}$ (sugiriendo esto que el Diurón no es volátil ni en

suelos ni en agua).

En cuanto a su comportamiento en suelos, se adsorbe sobre materia orgánica y en los minerales de la arcilla (Villaverde y col. 2006; Undabeytia y col. 2012). No se fotodegrada rápidamente aunque las pérdidas pueden ser importantes si el herbicida permanece en la superficie del suelo durante varios días o semanas. Su vía de disipación principal en suelos es la degradación microbiana del mismo. Es persistente, con tiempos de vida media entre un mes y un año (Field y col. 2003), y moderadamente lixiviable. Las pérdidas por volatilización son insignificantes, excepto cuando está expuesto en la superficie del suelo durante varios días o semanas bajo condiciones de sequedad o calor.

Los microorganismos son los principales agentes en la degradación de Diurón. La mayoría de los estudios se centran en la degradación de este herbicida por bacterias (El-Bestawy y Albrechtsen, 2007; El-Deeb y col. 2000; Sorensen y col. 2008) aunque también existen estudios donde la biodegradación es realizada por hongos (Ellegaard-Jensen y col. 2013, 2014). El herbicida Diurón es también una fuente de contaminación en el medio ambiente acuático, teniendo un potencial de bajo a moderado de bioconcentración en organismos acuáticos. Se encuentra en las aguas subterráneas con una concentración superior al límite establecido por la UE ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) (Lapworth y Gooddy 2006; Torstensson 2001). El Diurón y sus metabolitos fueron detectados en aguas superficiales y en los sedimentos (Thomassin-Lacroix y col. 2002).

♦ Mecanismo de acción

Inhibe el proceso fotosintético interfiriendo en la reacción de Hill, en el transporte de electrones en el fotosistema I ó II. En general, se da un cambio en la secuencia de aminoácidos Serina por Glicina lo que conlleva a la destrucción por fotooxidación de los carotenoides (Tomlin, 2000). Puede ser degradado por plantas superiores, existiendo diferencias entre ellas en cuanto a la tasa de metabolización, la cual se da a través de procesos como el de alquilación o conjugación. Este plaguicida se adsorbe fácilmente en el suelo, disminuyendo de esta forma su efectividad y dificultándose la recuperación de sus residuos del suelo.

♦ Aplicaciones

Este herbicida ha sido utilizado para controlar una amplia variedad de cultivos de hojas anchas y perennes, malezas de pastos persistentes o de emergencia, así como musgos. También es utilizado en zonas no cultivadas, tales como carreteras, camino de jardines y ferrocarril (Skark y col., 2004) a razón de $3 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ y en muchos cultivos agrícolas como frutas, algodón, azúcar de caña, alfalfa y trigo a $1,8 \text{ Kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$.

Es probable la absorción de Diurón durante su aplicación (Claver y col. 2006; Field y col. 2003). Se considera tóxico para el ser humano; provoca irritación en piel y mucosas al contacto. Los efectos sistémicos son sólo probables ante una ingesta considerable, y abarcan taquicardia y reducción de la capacidad pulmonar, náusea, vómitos, enfisema moderado y pérdida crónica de peso ante la exposición prolongada. Es un carcinógeno comprobado.

Es extremadamente tóxico para el fitoplancton, moderadamente tóxico para insectos y ligeramente tóxico para aves, anfibios y crustáceos. Su toxicidad en peces y moluscos varía de ligera a moderada y de ligera a alta para el zooplancton. Tiene efectos contaminantes en la capa freática.

♦ Metabolitos de Diurón

El cambio en la estructura molecular de un contaminante durante su biodegradación puede llevar a la obtención de productos diferentes al compuesto original, siendo estos, en general, más solubles, más oxidados, menos volátiles y menos tóxicos. En cambio, en el caso de este herbicida su principal metabolito, 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), es incluso más tóxico y persistente que el propio herbicida, el cual se acumula en el medio ambiente (Widehem y col. 2002; Dejonghe y col. 2003; Sorensen y col. 2008, 2009).

El coeficiente octanol-agua es bajo-moderado ($\log K_{ow} = 2.6$). Este compuesto presenta una constante de partición de la fracción orgánica del suelo (K_{oc}) de 485 que predice su afinidad de adsorción por las partículas orgánicas del suelo.

La estructura de este metabolito es la siguiente:

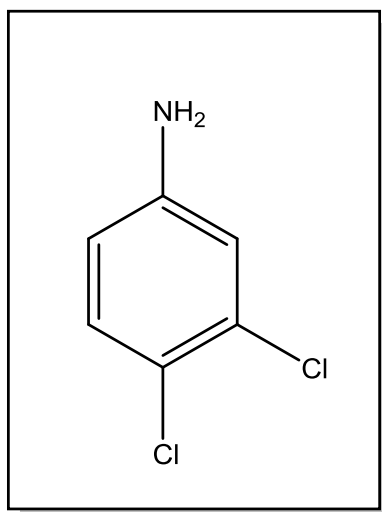


Figura 1.4. Estructura del metabolito 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA).

Por todo lo comentado anteriormente de este herbicida, esta Tesis estudia ampliamente su comportamiento en el sistema suelo-agua, los procesos de degradación y las características tóxicas del Diurón y su metabolito (3,4-DCA).

1.2. COMPORTAMIENTO DE LOS HERBICIDAS EN EL SUELO

1.2.1. Origen de los herbicidas en el suelo

La presencia de herbicidas en el suelo se produce por diversas vías. Unas veces se debe a los tratamientos que se efectúan directamente a las partes aéreas de las plantas para combatir sus plagas, donde un 50% aproximadamente del producto utilizado se deposita en el suelo; o bien, por arrastre del incorporado a la planta por acción de las lluvias o del viento. Este es el caso que normalmente se presenta en la aplicación de insecticidas, fungicidas y herbicidas. Otras veces, el tratamiento se hace directamente al suelo, como en la aplicación de algunos herbicidas, apareciendo el producto en cantidades mayores.

En menor proporción, pueden también proceder de restos vegetales diversos que quedan en el suelo al recolectar el cultivo. También hay que considerar el arrastre de restos suspendidos en la atmósfera por el viento o la lluvia.

1.2.2. Evolución de los herbicidas en el suelo

Cuando se aplica un herbicida al campo, éste se distribuye en las distintas fases del ambiente (suelo, agua, aire, animales y plantas). Esta distribución dependerá tanto de las propiedades del plaguicida como de las propiedades de las distintas fases. Concretamente, las interacciones que tienen lugar entre las moléculas del herbicida y las fracciones coloidales del suelo están influenciadas considerablemente por la humedad, temperatura, pH, contenido en minerales de la arcilla y contenido en materia orgánica del suelo. A su vez, también están relacionadas con las características de los herbicidas en cuanto a solubilidad en agua, polaridad, tamaño molecular y características químicas. De acuerdo con esto, el grado de adsorción de un herbicida por el suelo depende de la naturaleza de la fracción coloidal y de la estructura química del compuesto. En la Figura 1.5 se indican de forma esquemática los diversos procesos de inactivación, y pérdida que los herbicidas pueden sufrir en los suelos.

Los procesos involucrados en la dinámica de los herbicidas en el suelo pueden englobarse en dos grupos: procesos de transferencia y procesos de transformación. Los primeros hacen referencia a aquellos en los que el herbicida es movilizado de un medio a otro sin experimentar ningún tipo de transformación, mientras que los segundos hacen referencia a aquellos en los que el herbicida se transforma o degrada en otros compuestos que pueden ser de igual, mayor o menor toxicidad.

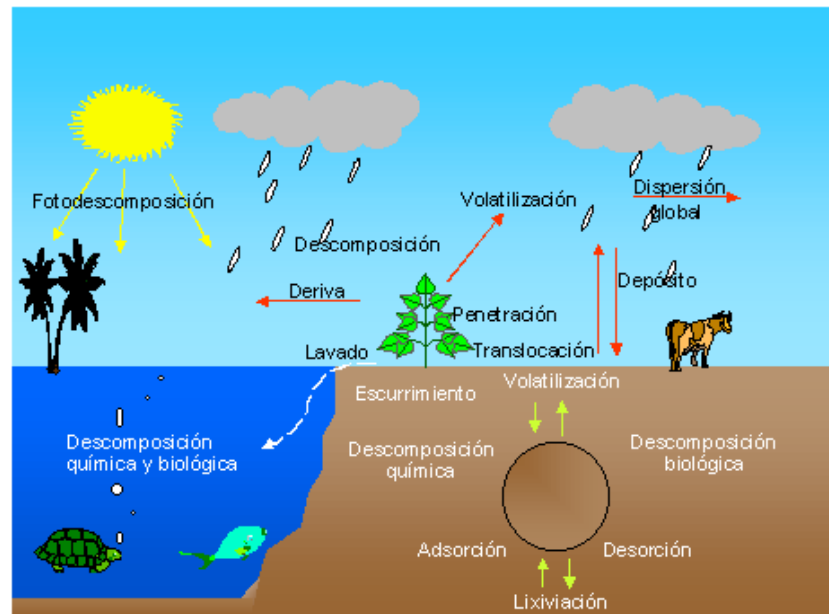


Figura 1.5. Dinámica de los herbicidas en el sistema suelo-agua-atmósfera.

Entre los procesos de transferencia se encuentran:

- a) Adsorción-desorción. Los procesos de adsorción y desorción son, entre los distintos factores a considerar, los más importantes en cuanto a la interacción de plaguicidas con suelos. El proceso de adsorción se debe a la atracción entre una superficie sólida y un vapor o disolución, y resulta de la interacción de fuerzas que emanan de la superficie del adsorbente y las moléculas o iones del adsorbato. Este concepto es aplicable al caso de los plaguicidas. Estos pueden actuar como adsorbatos y quedar retenidos en el suelo, que actúa como adsorbente. Estos procesos serán estudiados con más detalle en otro apartado posterior (apartado 3.4) de esta Introducción, debido a la importancia que revisten, al influir en todos los demás procesos (Sopeña y col. 2007b).
- b) Absorción, exudación y retención por las plantas. La absorción consiste en la penetración de agua o sustancias sólidas, líquidas o gaseosas disueltas en ella, en las plantas. Puede realizarse por las raíces o por las hojas. La exudación es la salida de líquido de los órganos de las plantas en condiciones patológicas o al ser lesionados. La retención de herbicidas por las plantas depende de las propiedades del herbicida (Gutiérrez y Arregui, 2000) tanto para la maleza como para plantas de interés agrícola.
- c) Lixiviación. Se denomina también percolación o flujo de masas. La lixiviación es un proceso frecuente de transporte de los herbicidas en profundidad a lo largo del perfil del suelo, que puede tener lugar tanto si el plaguicida está en solución como en fase sólida (por arrastre mecánico o lavado del mismo), debido a la influencia del agua, tanto de riego como de lluvia

(Carter, 2000). Los procesos de movimiento de masas y de difusión están implicados en ambos casos (Taboada y col. 1994). Los factores a tener en cuenta que influyen en la lixiviación son: las características físico-químicas del suelo, frecuencia e intensidad de la lluvia y el riego, solubilidad del plaguicida y posibilidad de adsorción del plaguicida en los coloides del suelo (Carter, 2000; Andrades y col. 2001; Andrades y col. 2004; Maqueda y col. 2008 y Undabeytia y col. 2013).

d) Difusión. Es el proceso por el cual el plaguicida es transportado en el suelo como resultado de un movimiento molecular al azar, causado por la energía térmica de las moléculas. A causa de ella, hay un neto movimiento de posiciones de alta concentración a otras de menor concentración, y su importancia depende fundamentalmente de su solubilidad y de la presión de vapor del plaguicida. Los factores más influyentes en la difusión de los herbicidas en el suelo son: la solubilidad, la temperatura (la difusión tiende a aumentar al hacerlo la temperatura), la humedad y porosidad del suelo (al aumentar la humedad, aumenta la difusión), la densidad de vapor y el grado de adsorción del plaguicida. Un incremento de la adsorción reduce la difusión, por lo que altos contenidos de humus, minerales de la arcilla u óxidos del hierro y aluminio, al aumentar la adsorción del plaguicida influirán en su difusión (Cheng, 1990).

e) Volatilización. Es un proceso frecuente en el movimiento y desaparición de herbicidas en el suelo, que consiste en el flujo del compuesto hacia la fase aire y supone uno de los mecanismos de pérdida de masa hacia la atmósfera. La volatilidad potencial está relacionada con la presión de vapor, pero la volatilidad efectiva depende, además de la temperatura, composición del suelo, contenido en agua, naturaleza del plaguicida y grado de adsorción. Se ha visto que las mayores pérdidas por volatilización se producen en residuos localizados a nivel superficial y con suelos húmedos (Carter, 2000).

f) Erosión o arrastre. Al estar los herbicidas tan íntimamente ligados a las partículas del suelo, ya sea por adsorción sobre las mismas o por simple mezcla, estas partículas pueden actuar como portadores del plaguicida sobre la superficie del suelo cuando son movidas de un lugar a otro por el agua o el aire, mediante el proceso de erosión (Cheng, 1990; Carter, 2000).

Entre los procesos de transformación cabe señalar:

a) Degradación química y microbiológica. Están íntimamente ligadas entre sí siendo difícil establecer independencia entre ellas, por lo que se puede denominar degradación bioquímica.

Así, la degradación química procede principalmente mediante reacciones de hidrólisis, oxidación y reducción, pudiéndose dar también isomerización, deshalogenación, desalquilación, reacciones de dismutación y reacciones con radicales libres (Blumhorst y Weber, 1992; Smith y Aubin, 1993).

La degradación microbiológica es quizá el mecanismo de descomposición de herbicidas más importante, en el que las bacterias, algas y hongos del suelo los descomponen para su uso como fuente de nutrientes y energía para su crecimiento (Blumhorst y Weber, 1992; Bending y col. 2007).

Por último, hay que señalar que la descomposición bioquímica de los herbicidas depende principalmente de la estructura química de la molécula, frecuencia y cantidad de aplicación, presencia de otros plaguicidas y de las condiciones del sistema suelo: composición, humedad, aireación, sustancias catalizadoras, biodisponibilidad de fósforo y nitrógeno, y tipo de microorganismos presentes (Alkhatib y Weigand, 2002; Bending y col. 2007; Bending y Rodríguez-Cruz, 2007).

b) Degradación fotoquímica. Consiste en la degradación no biológica de los herbicidas mediante la luz solar. La luz ultravioleta induce una gran variedad de reacciones tales como oxidación, reducción, hidrólisis e isomerización de muchos herbicidas, que incluyen ácidos fenoxiacéticos como 2,4-D, fenilureas como Diurón, amidas tales como CDAA, dinitroamidas como la trifluralina, ácidos bezoicos como dicamba, carbamatos como profan, herbicidas fenólicos como dinitrito-orto-cresol (DNOC), triazoles como aminotrizol (Katago, 2004). La cantidad de herbicida fotoquímicamente degradado depende a su vez del método de aplicación, su tiempo de exposición, del grado de adsorción del plaguicida en el suelo, presencia de catalizadores fotoquímicos, pH del suelo y grado de aireación del mismo. La degradación puede alcanzar desde un bajo porcentaje para un herbicida que se incorpora al suelo, hasta más de un 90% para un herbicida en la solución del suelo (Villaverde y col. 2007; Sopeña y col. 2011).

1.2.3. Adsorción-desorción de los herbicidas en el suelo

Son los procesos más importantes, ya que condicionan directa o indirectamente la magnitud de los demás: la adsorción determinará si el herbicida será o no persistente, si será transportado a lo largo del perfil del suelo convirtiéndose en un contaminante de las aguas subterráneas y frecuentemente, si será eficaz o no (Wauchope y col. 2002). La adsorción puede definirse como cualquier cambio en la concentración de una sustancia en una interfase que es diferente del seno de la fase original (solución, gas, sólido). El sistema suelo es un sistema complejo, estando formado por muchas fases que incluyen sólidos, partículas coloidales, solución del suelo, solutos como nutrientes, otras sustancias orgánicas naturales presentes o gases, como CO₂ y O₂.

Un factor adicional a tener en cuenta es la variedad de mecanismos de adsorción que son posibles dependiendo de las propiedades químicas y físicas del herbicida. Así, los herbicidas iónicos son adsorbidos por los coloides del suelo mediante fuerzas coulombicas dependiendo de

su carga iónica. Concretamente, los herbicidas catiónicos se adsorben por reacciones de intercambio catiónico, las especies aniónicas son repelidas por los coloides del suelo cargados negativamente y atraídas hacia los cargados positivamente. Por otra parte, los aniones fosforados se complejan con los coloides del suelo por intercambio de ligando y por reacciones de precipitación. Los herbicidas que se presentan en forma molecular se unen a los coloides del suelo por enlaces de hidrógeno (fuerzas dipolo-dipolo dirigidas directamente), complejos de transferencia de carga, o por fuerzas de Van der Waals, de London o Deybe y aquellos que son altamente apolares, por enlaces hidrofóbicos (Wauchope y col. 2002; Kudsk y Streibig, 2003).

Los diferentes mecanismos de adsorción dan lugar a diferentes tipos de isothermas de adsorción (Calvet, 1989). Las isothermas de adsorción sirven para caracterizar el comportamiento de herbicidas en suelo y consisten en determinar la cantidad de herbicida adsorbido por cantidad prefijada de sustancia adsorbente (García Torres y Fernández-Quintanilla, 1991). Se pueden establecer cuatro tipos diferentes de isothermas, que implican una afinidad distinta del adsorbato por el adsorbente:

- *Isotherma tipo S*: presentan una pendiente inicial baja que aumenta con la adsorción y vuelve a disminuir a adsorción alta. Sugiere una afinidad de la superficie por el adsorbato menor que la de la solución, probablemente debido a competencia entre el adsorbato y el disolvente.

- *Isotherma tipo L*: indican una afinidad relativamente alta de la superficie por el adsorbato, que disminuye al aumentar la adsorción como consecuencia de una disminución en la superficie disponible, de aquí que la pendiente vaya disminuyendo con la adsorción hasta alcanzar un valor constante.

- *Isotherma tipo H*: son un caso extremo de la curva tipo L, con una pendiente inicial muy grande, sugiriendo una afinidad muy alta.

- *Isotherma tipo C*: presentan una pendiente constante hasta alcanzar la adsorción máxima posible, y son debidas a una distribución constante del adsorbato entre la interfase y la solución.

El proceso inverso de la adsorción es la desorción y ésta puede ser total (adsorción reversible) o puede no serlo en gran medida (adsorción parcialmente irreversible). Las diferencias entre las isothermas de adsorción y desorción obtenidas para un mismo soluto es lo que se denomina histéresis, es decir, la cantidad de soluto que queda retenido por el adsorbente en los procesos de desorción es diferente de la esperada de acuerdo con su isoterma de adsorción, para una concentración de equilibrio dada (Morillo y col. 2004).

Los procesos de adsorción-desorción no sólo están influenciados por la naturaleza físico-química de los herbicidas, sino también por otra serie de factores suelo-dependientes (Sánchez-Martín y col. 2006; Rodríguez-Cruz y col. 2006). Entre estos factores se pueden citar la humedad, temperatura, pH, contenido en minerales de la arcilla y contenido en materia orgánica del suelo (Wauchope y col. 2002).

La volatilización de los herbicidas se incrementa con la temperatura, así como su metabolización. Al mismo tiempo, aumenta la pérdida de agua del suelo dejando más centros activos libres para unirse al herbicida, aumentando la adsorción y disminuyendo la volatilización.

La humedad es una variable muy importante ya que determina el rendimiento de un herbicida controlando los niveles de oxígeno del suelo y abasteciendo los requerimientos de agua necesarios para los microorganismos. Es un factor esencial ya que un adecuado valor de ésta y de la temperatura asegura una actividad microbiológica adecuada. Además, el agua actúa como un disolvente y agente de transporte, como medio para procesos biológicos y no biológicos y es un agente de las reacciones hidrolíticas.

En general, la humedad del suelo produce una menor adsorción inicial del herbicida, ya que compite con los herbicidas iónicos por los sitios de adsorción, aumenta la difusión, la asimilación del producto por las plantas, y la volatilización, al unirse más moléculas de agua al suelo ocupando los sitios de adsorción (Patsias y col. 2002). El agua está adsorbida muy fuertemente en los lugares de adsorción del coloide por ser un compuesto muy polar. Por ello, los contenidos bajos en humedad provocan una fuerte retención del agua, que deja pocos sitios activos libres para que el herbicida pueda adsorberse. La retención de los compuestos orgánicos por los constituyentes minerales y orgánicos depende de la humedad del suelo. En suelos secos, la adsorción de compuestos orgánicos resulta fundamentalmente de las interacciones del herbicida con los componentes minerales, mientras que en los suelos húmedos, es la materia orgánica la que tienen un papel más importante. Esto es debido a la fuerte interacción de dipolo entre la fracción mineral del suelo y las moléculas de agua, la cual excluye a los compuestos orgánicos, especialmente los poco solubles en agua, de esta fracción del suelo. Así la solubilidad del herbicida en el agua sería uno de los principales factores que afectan al fenómeno de adsorción.

La adsorción de ciertos herbicidas aumenta al bajar el pH del suelo. Su efecto está directamente asociado al pKa del herbicida, a la carga variable del suelo, y al potencial redox del mismo, que es la causa de ciertos procesos degradativos de estos compuestos.

La presencia de cubierta vegetal, sobre todo de tubérculos, provoca una disminución del contenido en herbicidas del suelo, ya que asimilan parte de estos productos aumentando su tasa

de degradación, llegándose a comprobar que la cantidad de residuos de un producto en un suelo desnudo es siempre mayor que en un suelo cultivado. Los cultivos pueden modificar la temperatura y la humedad de la porción de suelo que cubren y por lo tanto, variar tanto la tasa de degradación como la adsorción de los herbicidas. Además, la presencia de raíces afecta a la actividad microbiológica del suelo.

❖ Adsorción de herbicidas sobre la materia orgánica

Las sustancias húmicas son los principales componentes de la materia orgánica del suelo y se dividen en 3 categorías, atendiendo a su solubilidad:

- 1) Ácidos fúlvicos: Solubles tanto en medio ácido como alcalino.
- 2) Ácidos húmicos: Solubles en medio alcalino, pero insolubles en medio ácido.
- 3) Huminas: Insolubles tanto en ácidos como en álcalis.

Todos ellos son polímeros de compuestos aromáticos que contienen cadenas alifáticas, aunque el grado de aromaticidad y los enlaces entre los distintos componentes no están bien definidos.

Respecto a la composición estructural sólo se conoce qué grupos funcionales, enlaces y anillos aromáticos están implicados, pero no su disposición dentro de la estructura. Los ácidos húmicos poseen una estructura básica con anillos aromáticos del tipo di- o trihidroxifenol, unidos entre ellos por enlaces, -NH-, -N=, -S-, etc. En cuanto a los ácidos fúlvicos, se ha establecido que consisten en ácidos fenólicos y bencencarboxilos unidos entre ellos a través de enlaces de hidrógeno para formar una estructura polimérica estable, la cual está extensamente sustituida por grupos funcionales conteniendo oxígeno. Los ácidos fúlvicos debido a sus bajos pesos moleculares y su alta acidez son más solubles que los húmicos y juegan un papel especial respecto a las transformaciones de los plaguicidas. Los ácidos fúlvicos pueden actuar como agentes transportadores para ciertos plaguicidas en suelos y aguas naturales, incluso para sustancias orgánicas que son insolubles en medio acuoso. Por otra parte, los ácidos fúlvicos, debido a su alto contenido en grupos funcionales, pueden catalizar la descomposición química de ciertos herbicidas; por ejemplo la hidroxilación de cloro-s-triazinas (Cox y col. 1996; Sun y Pignatello, 1993).

La materia orgánica tiene un papel muy importante en los procesos de adsorción-desorción y posterior movilidad de plaguicidas. Ello es debido a propiedades como la capacidad de cambio de cationes en las sustancias húmicas, que es más alta que la de los silicatos laminares, siendo del orden de 200 a 400 meq/100 g, y poseen además una gran área superficial. De hecho su importancia es tal, que se define el coeficiente K_{oc} para describir la adsorción de plaguicidas en

suelos, normalizado de acuerdo con el contenido de materia orgánica. Incluso se han llevado a cabo estudios basándose en la influencia de la materia orgánica en el ciclo biológico del plaguicida en suelos, incorporándose ésta de una forma exógena sobre suelos arenosos y así poder demostrar claramente esta estrecha relación.

Los mecanismos que operan en la adsorción de plaguicidas en la materia orgánica son el cambio iónico, cambio de ligandos, fuerzas de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, procesos de ión-dipolo y enlaces hidrofóbicos. Dichos mecanismos se encuentran solapados, siendo a veces difícil su distinción (Maqueda y col. 1998).

La materia orgánica, concretamente las sustancias húmicas, presentan un alto contenido en grupos químicos de naturaleza diferente, estando presentes tanto componentes hidrofílicos como hidrofóbicos. Los compuestos de baja solubilidad en agua se adsorberán preferencialmente en estas áreas hidrofóbicas mediante enlaces hidrofóbicos. La participación de los plaguicidas sobre estas superficies hidrofóbicas se realiza por interacciones soluto-solvente débiles, que son especialmente importantes en el caso de plaguicidas no iónicos, los cuales poseen altos valores de K_{oc} (Jones y Bryan, 1999).

Varios estudios sugieren que los contaminantes orgánicos presentan más afinidad por las superficies orgánicas que por los minerales. El contenido en materia orgánica actúa en un doble sentido ya que, si es activa, es decir con alta actividad microbiana, se favorece la degradación de los herbicidas. Sin embargo, como habitualmente también posee una capacidad de adsorción elevada, esto hace que se encuentren menos biodisponibles para ser degradados. Con respecto a la adsorción existe un cierto conflicto, ya que no siempre protege a un herbicida de la degradación, ni tampoco siempre lo lleva a degradarse más. En principio, reduciría la degradación al encontrarse el herbicida menos en contacto con la disolución del suelo, sin embargo, al ser la densidad de microorganismos cerca de las superficies de los coloides mayor que en la disolución del suelo, y como los lugares de adsorción puede que catalicen reacciones no biológicas, las moléculas de herbicida adsorbidas podrían, según los casos, degradarse rápidamente.

La adsorción a través de intercambio catiónico, se da en el caso de plaguicidas que, o bien son catiónicos en solución, por ejemplo los plaguicidas dicuat, paracuat y clordimeform (Maqueda y col. 1993), o bien pueden aceptar un protón de las superficies ácidas o de la solución del suelo y adsorberse como molécula protonada (Jacinthe y Pichtel, 1992). La capacidad de cambio de las sustancias húmicas de la materia orgánica es más elevada que la de los minerales de la arcilla y tienen además una superficie específica mayor, por tanto son más activas, lo que implica que a mayor contenido en materia orgánica, más capacidad tendrá el suelo de fijar herbicidas.

Los enlaces por puente de H son factibles dependiendo de la polaridad de la molécula del herbicida, que interacciona a través de los grupos funcionales de los ácidos húmicos que contienen hidroxilos y oxígenos. Las interacciones de transferencia de carga provienen de estructuras redox que las sustancias húmicas poseen, dando lugar a estructuras resonantes por transferencia de carga con núcleos aromáticos.

❖ Adsorción de herbicidas sobre los minerales de la arcilla

La fijación de moléculas orgánicas por minerales de la arcilla depende tanto de las características del silicato (naturaleza del silicato, densidad de carga laminar, naturaleza del catión que satura el espacio interlaminar, etc.) como de las propiedades de las moléculas adsorbidas (grupos funcionales, tamaño, capacidad de protonación, etc.).

En líneas generales las reacciones implicadas pueden clasificarse de la siguiente forma:

A) Procesos de cambio iónico: adsorción de moléculas cargadas

A. 1.) Cambio catiónico. El mecanismo de adsorción de moléculas cargadas por cambio catiónico se explica mediante el intercambio que puede producirse entre cationes minerales adsorbidos que compensan parte de las cargas superficiales de la arcilla y los cationes orgánicos presentes en la fase líquida en contacto con ella. El enlace tiene lugar por fuerzas electrostáticas.

Aunque existen pocos plaguicidas catiónicos, han sido ampliamente estudiados los herbicidas dicuat, paracuat, clordimeform y clormequat, (Morillo y Maqueda, 1992; Weber, 1994). Todos son bases fuertes y se ionizan completamente en agua. Debido a su carácter iónico, son altamente solubles en agua y fácilmente adsorbidos por los minerales de la arcilla.

Los cationes orgánicos presentan una serie de propiedades diferentes de los inorgánicos, los cuales determinan el proceso de cambio iónico en las arcillas:

- La adsorción está influida por otras fuerzas, como enlaces de hidrógeno, ión-dipolo y otras fuerzas físicas, cuya importancia depende en cada caso de factores tales como peso molecular, grupos funcionales y configuración de la molécula.
- La interacción del catión orgánico con el disolvente empleado puede hacer cambiar la adsorción de dicho catión.
- El efecto de la densidad y tipo de carga laminar condiciona la orientación de las moléculas en el espacio interlaminar.

A. 2.) Adsorción de moléculas orgánicas protonadas. Muchos compuestos orgánicos pueden adsorberse en el espacio interlaminar de los minerales de la arcilla protonándose y

convirtiéndose en cationes. La protonación puede tener lugar en la misma superficie de la arcilla o previamente en solución (Morillo y col. 1997b).

La protonación en la superficie de la arcilla depende de la acidez superficial y la protonación en solución depende del pH de la misma. En ambos casos hay que tener en cuenta el valor de pKa del compuesto. Cuando la protonación se da en solución, la especie protonada se adsorbe por intercambio catiónico.

B) Procesos de enlace de hidrógeno

B. 1.) Enlace de hidrógeno orgánico-orgánico. Cuando los cationes de cambio de la arcilla son orgánicos, existe la posibilidad de que estos interaccionen con otras especies orgánicas mediante enlaces de H. Es un proceso parecido a la formación de hemisales. El protón permanece asociado al catión orgánico inicialmente presente, pero interacciona con grupos polares negativos de la otra molécula.

B. 2.) Procesos por puentes de agua. Implican la unión de moléculas orgánicas polares al catión metálico de cambio a través de las moléculas de agua de su primera esfera de hidratación.

❖ *Adsorción de herbicidas sobre óxidos y oxihidróxidos*

La adsorción de plaguicidas sobre óxidos es importante, especialmente en plaguicidas ácidos, por interacciones electrostáticas vía adsorción del anión del herbicida sobre sitios de cargas dependientes del pH, cargados positivamente (Maqueda y col. 1986). Además de estas interacciones, otros mecanismos que pueden estar operando en la adsorción de plaguicidas sobre óxidos son interacciones dipolo-dipolo, como es el caso de la hidracida maleica sobre lepidrocrocita (Roldán y col. 1991) y la adsorción de primisulfuron sobre ferrihidrita, goetita, buserita y silica (Ukrainczyk y Ajwa, 1996).

En el estudio del plaguicida clorsulfuron, también ácido, se observó una estrecha relación entre la adsorción de este plaguicida y el número de grupos protonados FeOH_2^+ (Borggaard y Streibig, 1988). Sin embargo, a bajos pHs, la disminución en la adsorción de clorsulfuron no es fácilmente explicable si la protonación de grupos hidroxilos se considera el único factor importante en su adsorción. Los resultados pueden ser explicados atendiendo a otro mecanismo, como es el intercambio de ligando entre los grupos hidroxilos y el plaguicida. Este mecanismo es el que parece estar teniendo lugar también entre óxidos de hierro y plaguicida organofosforado glifosato (Maqueda y col. 2002).

1.2.4. Movilidad de los herbicidas en el suelo

Los herbicidas disueltos en la solución del suelo o adsorbidos en finas partículas son percolados o movilizados a través del suelo por fuerzas gravitacionales y en línea ascendente por capilaridad (Carter, 2000). Los procesos de movimiento de masas y de difusión están implicados en ambos casos (Taboada y col. 1994).

La movilidad relativa de un herbicida a través de columnas de suelo se estima comparando la cantidad de plaguicida que aparece en el lixiviado, su distribución en el perfil del suelo después del lixiviado y la distancia recorrida a la del frente de agua (R_f). Dependiendo del herbicida implicado y las condiciones del estudio, las cantidades de herbicida que aparecen en el lixiviado pueden ser desde no detectables hasta alcanzar más del 90%. Gómez de Barreda y col. (1993) observaron que la capacidad de lixiviación bajo las mismas condiciones disminuía en el orden: bromacilo > atrazina > simazina > terbumetona > terbutilazina > diurón > trifluralin. Por tanto, las propiedades físico-químicas de un herbicida determinan su tendencia a lixiviar. De todas ellas son particularmente importantes su capacidad de adsorción (K_d) y su vida media ($t_{1/2}$) en suelos. Ambas propiedades determinan la movilidad y la persistencia (Carter, 2000). Mediante la combinación de ambas características se puede calcular el índice GUS, mencionado en el apartado 1.1.3 de esta Introducción. Este índice junto con otros índices pueden resultar muy útiles para comparar movilidad relativa entre herbicidas sin referirse al uso o sitio específico (Wauchope y col. 2002).

Lo deseable sería encontrar 1% o menos del herbicida con sus metabolitos a una profundidad de 90 cm en el suelo bajo condiciones de campo. Sin embargo, dicho porcentaje puede aumentar considerablemente bajo ciertas circunstancias (Carter, 2000), como sería el caso de suelos en los que el agua se moviliza rápidamente a través de fisuras, macroporos o grietas (Carter, 2000).

Otros factores a tener en cuenta que influyen en la lixiviación son las características físicoquímicas del suelo (Carter, 2000; Andrades y col. 2001; Rodríguez-Cruz y col. 2006) y la frecuencia e intensidad de la lluvia y el riego (Sánchez-Camazano y col. 1996; Morillo y col. 2000; Undabeytia y col. 2000a; Singh y col. 2002).

El flujo de agua a través del suelo es normalmente estimado mediante la ecuación de Darcy, la difusión del herbicida a través de la fase líquida por la ley de Fick, la adsorción del herbicida por los coloides del suelo a través de la ecuación de Freundlich y la partición del herbicida con su vapor a través de la ley de Henry. Fundamentándose en estas ecuaciones y a través de numerosas hipótesis se han desarrollado numerosos programas de modelización (CREAMS,

PRZM, PESTAN, SESOILF, FOCUS) para predecir el movimiento de plaguicidas y herbicidas a través del suelo (Wauchope y col. 2002). En general, dichos modelos pueden clasificarse en dos grupos:

- Modelos determinísticos basados en ecuaciones diferenciales clásicas como de convección-dispersión.
- Modelos probabilísticos basados en el concepto de riesgo, y priorizando parámetros claves.

1.2.5. Biodegradación y mineralización de contaminantes orgánicos

La *biodegradación* es un término genérico para referirse a la actividad metabólica que llevan a cabo por los seres vivos (microorganismos, plantas y animales) para asimilar o modificar todo tipo de sustancias presentes en el medio ambiente. En este proceso, los contaminantes orgánicos son biotransformados porque generalmente los microorganismos pueden utilizarlos para su propio crecimiento como fuente de carbono y energía y, en el caso de que no sean capaces de crecer a partir de ellos, pueden seguir transformándolos si se les aporta un sustrato de crecimiento alternativo o cosustrato (Alexander, 1999). Para el crecimiento de los microorganismos es necesaria la presencia de donadores y aceptadores de electrones, una fuente de carbono y nutrientes (N, P, K, S, Mg, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu y elementos traza). El proceso más básico del metabolismo microbiano es la transferencia de electrones desde un sustrato donante hasta un sustrato aceptor. Los electrones son necesarios para oxidar (o reducir) los compuestos orgánicos, que son las fuentes de carbono, a la forma química utilizada por los constituyentes celulares y para generar la energía necesaria que posibilite la síntesis y el mantenimiento de la biomasa.

Además de los compuestos naturales, los elementos requeridos para el crecimiento celular pueden ser aportados por muchos contaminantes orgánicos. La mayoría de los contaminantes orgánicos, típicamente alifáticos o aromáticos, contienen diferentes grupos funcionales (-OH, -Cl, -NH₂, -NO₂, -SO₃, etc). Estos compuestos orgánicos, actuando como donadores de electrones, son oxidados durante el metabolismo microbiano para proporcionar energía para el crecimiento celular. Aunque el último metabolito generalmente es un compuesto de naturaleza orgánica, también puede llegarse a la obtención de CO₂, H₂O y/o sales inorgánicas, que es lo que se conoce como *mineralización*.

En ocasiones los compuestos contaminantes no se degradan, pero se acumulan en una forma inerte en el interior del organismo (*bioacumulación*), disminuyendo su toxicidad, excepto en algunos casos, como es el caso del Diurón siendo su metabolito, 3,4-DCA, más tóxico y persistente como se ha explicado en el apartado 1.1.4 de esta Introducción.

Nunca se produce una mineralización completa, debido a que una parte del material orgánico se transforma en células y una parte importante de la masa celular es, en efecto, no biodegradable. Sin embargo, la transformación de materiales tóxicos y peligrosos en una combinación de CO_2 y H_2O y nuevas células, elimina la mayor parte de los problemas que requieren recuperación. En la Figura 1.6 se esquematizan estos procesos referidos al herbicida Diurón.

Hay tres procesos por los cuales los microorganismos pueden biodegradar compuestos orgánicos: fermentación, respiración aerobia y respiración anaerobia. Durante la fermentación, los compuestos orgánicos son degradados mediante una serie de reacciones enzimáticas que no implican una cadena de transporte de electrones y pueden actuar como donadores de electrones o como aceptores. Durante la respiración aerobia, los microorganismos utilizan el oxígeno como aceptor de electrones para la respiración microbiana. Cuando la respiración tienen lugar en condiciones anaerobias, el oxígeno es reemplazado por compuestos o elementos orgánicos o inorgánicos oxidados que pueden ser utilizados como aceptores de electrones alternativos, como nitrato, iones metálicos Fe(III) , Mn(IV) , sulfato o dióxido de carbono.

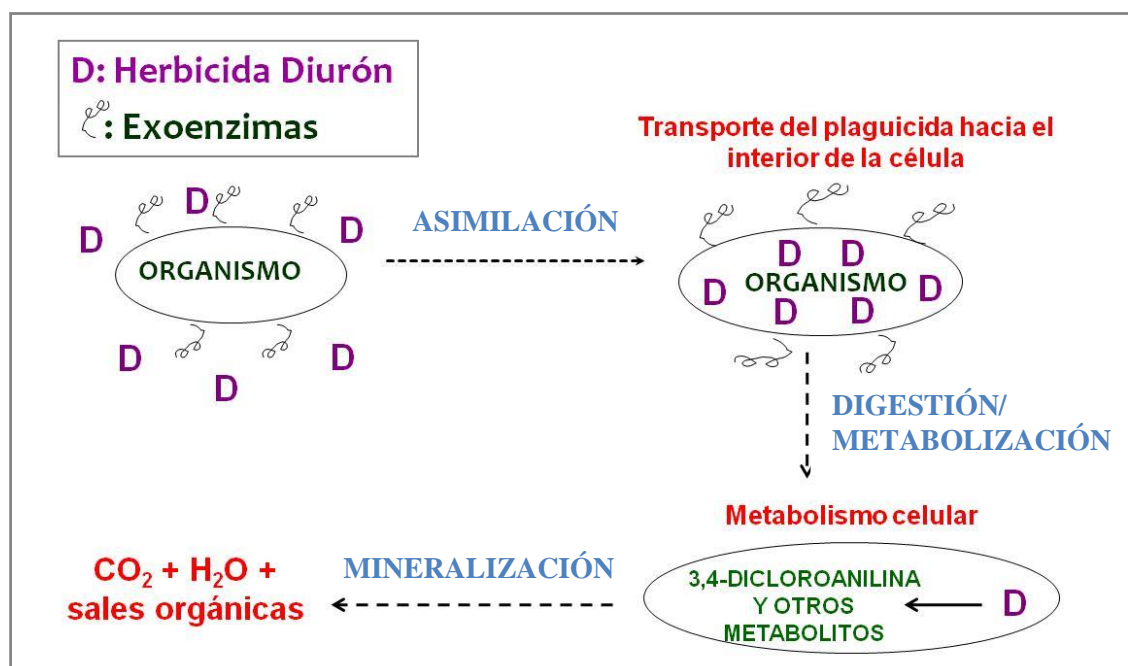


Figura 1.6. Esquema del proceso biodegradación-mineralización.

Por su parte, los compuestos orgánicos pueden ser metabolizados a metano, dióxido de carbono e hidrógeno. La biodegradación aeróbica presenta las ventajas de que los organismos aerobios crecen más rápido que los anaerobios y pueden mantener tasas de degradación más elevadas pero requiere un constante suministro de oxígeno que en frecuentes ocasiones puede limitar el proceso de biodegradación.

❖ Factores que afectan a la biodegradación

La biodegradación en un compuesto orgánico depende de varios factores, los cuales pueden clasificarse en tres grandes grupos: medioambientales, físicos y químicos.

A) Factores medioambientales

Los factores medioambientales son necesarios para proporcionar las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la biodegradación. Los cambios en la temperatura, pH, humedad, disponibilidad de nutrientes y oxígeno pueden afectar a los microorganismos. Aunque no existen unas condiciones que sean óptimas para todos los casos, sí que se habla de rangos óptimos para la biodegradación.

- **Temperatura**, es uno de los factores ambientales más importantes. Las bacterias de un terreno actúan habitualmente en el intervalo de 5 a 40 °C, aunque dentro de este rango, la temperatura óptima depende de la especie.
- **Variación del pH del suelo**, afectan tanto a la actividad microbiana como a la adsorción-desorción. En general, los microorganismos se desarrollan mejor dentro del rango de pH de 6 a 9, las condiciones óptimas de crecimiento están en los pH 7 y 8 (Alexander, 1999).
- **Nutrientes**, el nitrógeno y el fósforo son los que se precisan con más frecuencia, ya que normalmente sus cantidades en el suelo son insuficientes, sin embargo, otros nutrientes esenciales como son el Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4^{2-} , sí que se encuentran en el suelo en cantidades suficientes (Menn y col. 2000). En general la adicción de fuentes inorgánicas de N y P tiene un efecto positivo aumentando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación en suelos contaminados (Towell y col. 2011b).
- **Humedad**, es un factor importante ya que los microorganismos obtienen los nutrientes que necesitan para su crecimiento de soluciones, por lo que la humedad puede limitar la biodegradación. Como consecuencia de la baja solubilidad en agua del oxígeno, niveles elevados de humedad se traducen en baja disponibilidad de oxígeno, ya que el exceso de agua desplaza el aire presente en los poros del suelo, con lo que cuando se agote el oxígeno disuelto en el agua se generarán más fácilmente condiciones anaeróbicas (Alexander, 1999).

B) Factores físicos

Los factores físicos son los más importantes en la biodegradación son la biodisponibilidad del contaminante, la presencia de agua y la de un aceptor de electrones adecuado.

- La **disponibilidad**, está relacionada con la afinidad de los contaminantes por las fases sólida y gaseosa, la estructura intersticial de las fases sólidas y la presencia de las comunidades microbianas adecuadas. Todos los contaminantes tienen cierta afinidad hacia la fase sólida y gaseosa. Muchos de los contaminantes más habituales poseen una baja solubilidad en agua y son absorbidos con gran intensidad por partículas sólidas. Los contaminantes pueden acumularse en intersticios microscópicos demasiado pequeños para que las bacterias lo colonicen. Debido a que los microorganismos toman los nutrientes de la fase líquida, la tasa de biodegradación puede verse limitada por la velocidad con que se produce la desorción.
- **Agua**, debe estar en contacto con los contaminantes y estar presente en cantidad suficiente para permitir el desarrollo de las comunidades microbianas. La humedad óptima, en terrenos no saturados, para la biodegradación es de entre 150 y 250 gramos de agua por kilogramo de terreno seco.
- **Presencia de un aceptor de electrones adecuado**, tras la oxidación de los compuestos orgánicos por los microorganismos, se generan electrones que intervienen en una serie de reacciones que ocurren en el interior de la célula, para a continuación ser vertidos en el entorno. En el metabolismo aerobio, el aceptor final de electrones es el oxígeno y el agua es el producto.

C) Factores químicos

El factor químico más importante en biodegradación es la estructura molecular del contaminante, y cómo ésta afecta a propiedades químicas y físicas y su capacidad para ser biodegradado. La capacidad para ser biodegradado está relacionada con factores tales como la hidrosolubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes (Tejada y col. 2008; Haritash y Kaushik 2009). La solubilidad constituye una propiedad fundamental, ya que los microorganismos toman nutrientes de una solución acuosa. En general, una elevada solubilidad se traduce en una mayor disponibilidad potencial de un compuesto; el grado de saturación está relacionado con la volatilidad y solubilidad; la presencia de anillos saturados o alcanos muy ramificados, dificulta la degradación.

Papel de los consorcios bacterianos en la biodegradación de herbicidas

La alternativa a la utilización de cepas individuales es la obtención y utilización de cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos.

- **Consortios definidos** se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí (Foght y col. 1998). En los

consorcios definidos es posible la formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (Casellas y col. 1998; Kazunga y Aitken, 2000; Kazunga y col. 2001).

- **Consorcios no definidos** se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación (Venkateswaran y col. 1995; Sugiura y col. 1997; Budzinski y col. 1998) y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas. Es más probable que, en un consorcio no definido, se hayan seleccionado degradadores de productos finales (dead-end products) que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Grifoll y col. 1995).

1.2.6. Biodisponibilidad, bioaccesibilidad y envejecimiento

Uno de los principales factores influyentes en la extensión del proceso de biodegradación en los suelos es la *biodisponibilidad* de los compuestos. El término *biodisponibilidad* hace referencia a la disponibilidad total para ser captado por un organismo vivo en su hábitat en un momento determinado (Semple y col 2004). En el caso de una sustancia tóxica, cuanto más biodisponible sea mayor será su efecto nocivo sobre los seres vivos (ISO17402:2011). La biodisponibilidad está determinada por las propiedades fisicoquímicas del compuesto, principalmente por su solubilidad en líquidos, o su capacidad para adsorberse en sustancias sólidas o para volatilizarse. Sustancias volátiles o fuertemente adsorbidas en partículas sólidas no van estar al alcance de muchos seres vivos, lo que reduce su potencial de toxicidad.

La asociación de una sustancia a componentes sólidos del suelo como arcillas o materia orgánica, así como su solubilidad en líquidos no acuosos, limita su *bioaccesibilidad*. Definiendo *bioaccesibilidad* de una sustancia tóxica como la disponibilidad de ésta para ser ingerida por un organismo, si este tiene acceso a dicha sustancia en el momento o en otro periodo de tiempo (Semple y col 2004). A continuación se muestra la Figura 1.7 donde quedan reflejados estos conceptos de forma esquemática.

La mayoría de los reglamentos y procedimientos de evaluación de suelos contaminados aceptados todavía se basan en las concentraciones totales de contaminantes y no tienen en cuenta la posibilidad de que los contaminantes estén disponibles en forma que puedan afectar negativamente a la salud humana o el medio ambiente (Alexander, 1999). Es más útil y rentable un enfoque basado en el riesgo que representa la fracción biodisponible del contaminante en el suelo, que necesitará ser eliminado, que en el total de contaminante (Semple y col. 2004).

Además, una baja biodisponibilidad constituye una de las principales limitaciones de la recuperación de suelos y sedimentos contaminados por hidrocarburos, plaguicidas y explosivos,

dado que provoca que las tasas de biodegradación sean más lentas de lo deseado, dando así lugar a la persistencia de los compuestos biodegradables (ISO 17402:2011).

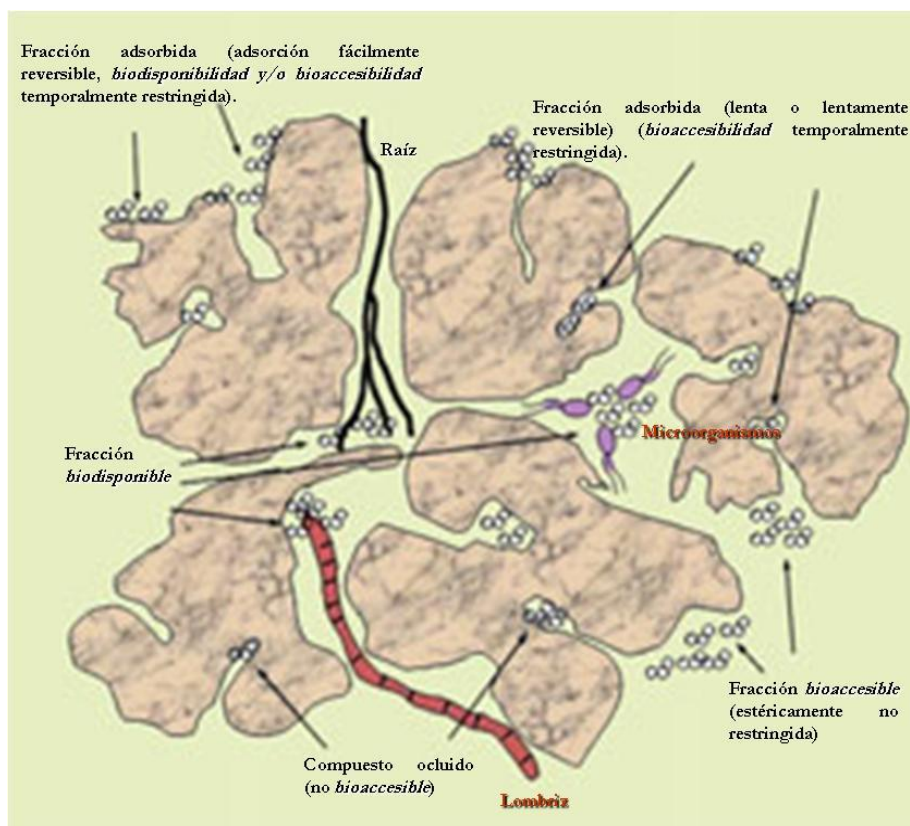


Figura 1.7. Concepto de biodisponibilidad y bioaccesibilidad de un contaminante en suelo mostrado de manera esquemática.

Por otro lado, dado que una baja biodisponibilidad reduce mucho la toxicidad de un compuesto, en algunas ocasiones se recurre a la disminución de la biodisponibilidad como método para remediar un suelo contaminado. La biodisponibilidad de una sustancia tóxica en el suelo suele disminuir con el tiempo, proceso que se ha denominado *envejecimiento*. Estos compuestos se adsorben, pudiendo penetrar en el interior de los agregados del suelo a lo largo del tiempo y llegando a envejecer.

La incorporación de los compuestos orgánicos a los suelos, implica a menudo dos procesos cinéticamente distintos: un proceso inicial rápido y reversible, seguido de un periodo largo y lento que puede ocurrir en unas semanas, meses o quizás años. Es esta lenta adsorción la que conlleva que una fracción de estos compuestos sea resistente a la desorción. Es en este caso donde se habla de compuestos envejecidos (Gevao y col. 2003).

Han sido varios los mecanismos descritos para el envejecimiento de los compuestos orgánicos en suelos, pero de forma esquematizada podría decirse que en el envejecimiento están implicados

varios procesos: difusión hacia los microporos del suelo, reparto dentro de la materia orgánica del suelo, alta adsorción a la superficie del suelo, o bien una combinación de estos procesos (Sánchez-Trujillo y col. 2013). De esta forma la tasa de biodegradación de los compuestos envejecidos puede estar limitada por la tasa de difusión desde los microporos, la repartición hacia fuera de la materia orgánica, o la desorción desde la superficie (Alexander y Scow, 1989). Las moléculas se mueven lentamente hacia el interior de la matriz del suelo, donde los sitios resultan inaccesibles para los microorganismos.

Diferentes mecanismos han sido propuestos en la bibliografía para intentar explicar la formación de los residuos envejecidos en suelo, por ejemplo, los procesos de adsorción sobre las partículas del suelo (Nam y Kim, 2002; Sharer y col. 2003; Godskesen y col. 2005; Regitano y col. 2006; Mamy y Barriuso, 2007; Villaverde y col. 2007; Maqueda y col. 2009); difusión a través de macro- y micro-poros (Pignatello y Xing 1996; Nam y Alexander, 1998a; Wanner y col. 2000; Lu y Pignatello, 2002; Sun y col. 2003); y atrapamiento en el interior de la matriz orgánica del suelo (White y col. 1999; Gevaio y col. 2000; Walker y col. 2005; Louchart y Voltz, 2007). El conocimiento actual sobre los mecanismos relacionados con la formación de estos residuos (Gevaio y col. 2000) nos sugiere que la evaluación de su toxicidad va a depender fundamentalmente de los procesos de descomposición de la materia orgánica del suelo (principal componente relacionado con la formación de residuos envejecidos), y por lo tanto el impacto medioambiental de estos residuos va a depender de la extensión en que estos llegan a ser indistinguibles de la propia materia orgánica del suelo, a través de sufrir repetidas transformaciones, lo que significaría una solución medioambiental para dichos residuos.

1.3. RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS

1.3.1. Problemática medioambiental derivada del uso de plaguicidas

Debido al aumento demográfico a escala mundial, en los últimos años se ha tendido hacia una agricultura productiva, ya que las plantas constituyen la principal fuente de alimentos en el mundo. El aumento de la productividad se ha desarrollado con la difusión de nuevas variedades de cultivo de alto rendimiento, unido a nuevas prácticas agrícolas que utilizan grandes cantidades de fertilizantes y plaguicidas, así como tractores y otra maquinaria pesada. Los beneficios alcanzados por esta mejora agrícola son indiscutibles, pero han surgido diversos problemas entre los que destacan los daños medioambientales generados, incluyendo la erosión del suelo, la salinización y el anegamiento de suelos muy irrigados, el agotamiento de acuíferos, deforestación, etc., así como la contaminación del medioambiente por el uso excesivo de plaguicidas.

Los plaguicidas se aplican en dosis muy altas, y posiblemente tóxicas, que frecuentemente decrecen en el campo con el tiempo hasta concentraciones por debajo de su nivel de efectividad mínimo. Como consecuencia, se necesita volver a aplicar repetidas veces o utilizar elevadas dosis de plaguicidas para poder mantener controlada una plaga. Hay que tener en cuenta que no todo el plaguicida que se aplica alcanza su objetivo y que cuando los plaguicidas alcanzan la superficie del suelo, como se ha visto anteriormente, pueden sufrir una serie de procesos tales como degradación química y/o biológica, fotodescomposición, etc. También pueden producirse pérdidas por escorrentías y lixiviación a lo largo del perfil del suelo. Esto último puede producir tres efectos:

- 1. Reducción de la concentración del herbicida en la parte superior del suelo por debajo de los umbrales necesarios para el control de las malas hierbas, y acumulación excesiva en la zona raíz del cultivo a niveles para la seguridad del mismo.
- 2. Aumento de la actividad residual del herbicida, ya que la actividad microbiana responsable de la degradación de la mayoría de los herbicidas decrece con la profundidad.
- 3. El agua que se infiltra en el suelo puede transportar herbicidas a través y por debajo de la zona raíz, pudiendo alcanzar y contaminar aguas subterráneas.

Todo lo anterior ha conducido a la aparición de una serie de iniciativas y a la adopción de ciertas medidas para preservar al medioambiente de los efectos adversos provocados por los plaguicidas. En este sentido, la Unión Europea ha establecido normativas escritas sobre los límites máximos de residuos de plaguicidas (LMR) que pueden encontrarse en aguas de consumo (Directiva 2000/60/CE), así como sobre la protección de aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro (Directiva 2006/118/CE), estipulándose en ambas que el nivel de un único plaguicida, incluidos los metabolitos y los productos de degradación y reacción que sean pertinentes, sea inferior a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ y que el correspondiente a los plaguicidas totales sea inferior a $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, en aguas de consumo.

No obstante todo lo anterior, hay que reconocer que los plaguicidas, en general, y los herbicidas, en particular, contribuyen significativamente al sostenimiento y protección de los cultivos, siendo indispensables para la agricultura moderna. Sin embargo, a pesar de los beneficios de los herbicidas, en la sociedad hay una urgente necesidad de optimizar su uso, no sólo en respuesta a las normativas anteriores, o sobre contaminación medioambiental, sino también para asegurar el mantenimiento de los herbicidas como una herramienta efectiva y valiosa para los agricultores en el futuro (Kudsk y Streibig, 2003).

1.3.2. Definición de suelo contaminado

Hasta la fecha no existe una normativa de protección del suelo de ámbito europeo. No obstante hay algunos países como Dinamarca, Holanda, Reino Unido, Alemania, Suecia, Bélgica y España que sí han desarrollado una normativa específica relacionada con la protección de la contaminación de los suelos.

Con el Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (1995-2005) (resolución de 28 de Abril de 1995), el gobierno español inventarió más de 18000 actividades industriales, a partir de las cuales se catalogaron, como potencialmente contaminados, más de 4500 emplazamientos. Entre las actividades se contempla la fabricación y comercialización de fertilizantes, plaguicidas y otros productos químicos empleados a agricultura. Con la Ley 10/1998 de 21 de abril de residuos, se promulga en España la primera norma legal que permite la protección eficaz de los suelos contra la contaminación, y en el caso de los que ya estuvieran contaminados, identificarlos y caracterizarlos con una metodología normalizada. En el artículo 3 de la citada ley se define como “suelo contaminado” todo aquel cuyas características físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes de carácter peligroso de origen humano, en concentración tal que comporte un riesgo para la salud humana o el medio ambiente, de acuerdo con los estándares que se determinen por el Gobierno.

Por lo tanto será necesario conocer cuáles serán los estándares de contaminación del suelo para declarar, legalmente, un suelo como contaminado.

Los suelos contaminados en España están regulados en la Ley 22/2011, de 28 de julio, de Residuos y suelos contaminados y en el Real Decreto 9/2005 de 14 de enero, se recoge la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo (101 áreas de trabajo, donde se engloban las 18000 actividades inventariadas en el Plan Nacional de recuperación de suelos contaminados (1995-2005)) así como los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. En el anexo IV se establecen los criterios para la identificación de suelos que requieren valoración de riesgos, entre ellos se incluyen aquellos suelos que superan ciertas concentraciones de algunos plaguicidas (pp'-DDT, dieldrin, endrin, endosulfan). El herbicida Diurón no está contemplado en la normativa española, pero sí en la lista de sustancias tóxicas prioritarias de la Comisión Europea detallado en el apartado 1.1.4 de esta Introducción.

Las muestras de análisis del suelo, agua y comidas se utilizan como una indicación del grado y las fuentes de contaminación del medio ambiente, proporcionando además información importante sobre los riesgos de estos recursos para la población (Castelo-Grande y col. 2010).

Es importante entender que el éxito de un proceso de descontaminación tiene lugar mediante la selección, el diseño y el funcionamiento de las técnicas de remediación, las cuales deben seleccionarse en base a las características de los contaminantes y el suelo que se desea recuperar (Castelo-Grande y col. 2010). Las técnicas de recuperación de suelos se pueden clasificar, según la naturaleza del tratamiento: tratamientos térmicos, físicos-químicos y biológicos (Sparks y Corn, 1993). A continuación se detallan los tratamientos más importantes.

1.3.3. Técnicas de recuperación de suelos contaminados

1.3.3.1. Tratamientos térmicos

A. Incineración

Es un tratamiento *ex situ* en el que los contaminantes son destruidos mediante el suministro de calor. El suelo se somete a elevadas temperaturas, alrededor de los 1000 °C, con el fin de oxidar y volatilizar los compuestos orgánicos contaminantes. Este proceso genera gases y cenizas residuales, orgánicos (hidrocarburos aromáticos policíclicos y sulfurados, compuestos oxigenados, compuestos aromáticos nitrogenados, etc.) e inorgánicos (metales pesados volátiles, CO₂, NO_x, SO_x) (Ross y col. 2002) que deben ser depurados. Está indicado para recuperar suelos contaminados con explosivos y residuos peligrosos, particularmente hidrocarburos clorados, PCBs y dioxinas (Silcox y col. 1995).

B. Desorción térmica

Se trata de otro tratamiento térmico *ex situ* en el que se somete al suelo a unas temperaturas más bajas (90-320 °C, desorción térmica de baja temperatura; 320-560 °C, desorción térmica de alta temperatura) para conseguir la desorción en vez de la destrucción de los contaminantes que persigue la incineración. Las temperaturas empleadas están elegidas para volatilizar contaminantes orgánicos, pero no para oxidarlos. Mediante la desorción térmica de baja temperatura se pueden recuperar suelos contaminados con compuestos orgánicos semivolátiles no halogenados, combustibles y en algunos casos compuestos orgánicos semivolátiles (Castelo-Grande y col. 2010). Mediante la desorción térmica de alta temperatura se pueden tratar las sustancias anteriores además de hidrocarburos aromáticos policíclicos, PCBs y plaguicidas (Chang y Yen, 2006; Castelo-Grande y col. 2009).

1.3.3.2. Tratamientos físico-químicos

A. Flushing

El *flushing* es un tratamiento *in situ* que consiste en anegar los suelos contaminados con una solución que transporte los contaminantes a una zona determinada y localizada donde puedan ser eliminados (Castelo-Grande y col. 2010). Así, los contaminantes son extraídos del suelo

haciéndole pasar agua u otras soluciones acuosas mediante un sistema de inyección o infiltración. El *flushing* se aplica a todo tipo de contaminantes, especialmente a compuestos inorgánicos incluidos los elementos radioactivos, y que se suele combinar con otros tratamientos como la biodegradación. Asimismo, es difícil de aplicar en suelos de baja permeabilidad o ricos en elementos finos y requiere una vigilancia estrecha para impedir que los contaminantes migren en otra dirección distinta a la deseada (Johnston y col. 2002).

B. Extracción con disolventes y otros agentes químicos

Este tratamiento se basa en la extracción de los contaminantes mediante la mezcla con un disolvente orgánico como acetona, hexano, metanol, butanol, etc. El disolvente orgánico arrastra los contaminantes y los separa del suelo, eliminándolos.

Otros métodos alternativos de recuperación *in situ* están basados en unas mejoras tecnológicas, con agentes químicos que provocarían un aumento de la movilidad del contaminante en la zona contaminada (Boving y Brusseau, 2000). El incremento de la masa eliminada reduce el tiempo de recuperación y, paralelamente, el coste económico. Los agentes químicos que se usan para estos métodos son: cosolventes (Krauss y Wilcke, 2001), materia orgánica disuelta (Conte y col. 2005; Cabrera y col. 2008); tensoactivos o surfactantes sintéticos (Sánchez-Martín y col, 2003) y agentes complejantes como las ciclodextrinas (Badr y col. 2004; Viglianti y col. 2006 a,b; Villaverde, 2007). Estos agentes complejantes se desarrollarán extensamente en el apartado 1.4 por la gran importancia que presentan en esta Tesis.

1.3.3.3. Tratamientos biológicos

La *biorrecuperación* se define como todos aquellos tratamientos de recuperación que degradan contaminantes orgánicos o disminuyen la toxicidad de otros contaminantes inorgánicos a través de la actividad biológica natural, principalmente la de los microorganismos, mediante reacciones que forman parte de sus procesos metabólicos (Atlas y Philp, 2005). Estos tratamientos utilizan bacterias, hongos y plantas para detoxificar las sustancias de riesgo para el hombre y el medio ambiente (Tyagi y col. 2011).

En la actualidad, hay un interés creciente por los métodos de recuperación biológicos ya que emplean tecnologías más sencillas y más respetuosas con el medio ambiente que otros tratamientos en los que los contaminantes son simplemente extraídos y transportados a otros lugares (Van Elsas y col. 2007). La biorrecuperación con microorganismos puede realizarse tanto *in situ* como *ex situ*, aunque el tratamiento *ex situ* en biorreactores es el preferido para la recuperación de suelos y sedimentos que poseen una mezcla de los contaminantes recalcitrantes y/o altas concentraciones, a pesar de sus elevados costes, ya que evitan el riesgo de escape de

esos contaminantes durante el tratamiento. Hay una gran diferencia entre el número de trabajos publicados referentes a biorreactores a escala de laboratorio (Villaverde y col. 2012) y a escala piloto o real, que son escasos (Molnar y col. 2005; Rivero-Huguet y col. 2011).

Un factor limitante para la biorrecuperación es que todavía no se conocen en profundidad los mecanismos que controlan el crecimiento y la actividad de los microorganismos en ambientes contaminados. Si se dispusiera de modelos capaces de predecir la actividad de los microorganismos durante los tratamientos de biorrecuperación, se resolverían muchas de las cuestiones que hoy se desconocen y, aunque la biorrecuperación actual está todavía lejos de este objetivo, sí parece que se pueda lograr en un futuro no muy lejano. Así, los avances en los métodos de secuenciación de ADN y de análisis de expresión y función génica, además de los adelantos en el desarrollo de modelos del metabolismo microbiano, están revolucionando el estudio de la microbiología ambiental (Lovley, 2003).

Dentro de los tratamientos biológicos *in situ* se engloban a la atenuación natural, biodegradación asistida, la fitorrecuperación y *bioventing*. Por otro lado, en los procesos *ex situ* se puede hablar de *landfarming*, biopilas, compostaje y lodos biológicos.

A continuación, se explicarán con detalle estos tratamientos biológicos.

A.1. Procesos *in situ*

A.1.1. Atenuación natural

La atenuación natural, también llamada *recuperación pasiva o intrínseca*, se está utilizando cada vez más dado que se trata de un método de recuperación de suelos y aguas contaminadas de bajo coste (Yong y Mulligan, 2004). De acuerdo con la USEPA (1999), la atenuación natural consiste en utilizar procesos naturales para contener la propagación de la contaminación procedente de los vertidos químicos y reducir la concentración y la cantidad de los agentes tóxicos en las zonas contaminadas. Como ya se ha mencionado anteriormente, los procesos naturales que tienen lugar en la recuperación son biológicos, como la biodegradación aerobia, anaerobia y co-metabólica, y procesos físico-químicos, como la dispersión, volatilización, dilución, estabilización química, y bioquímica, precipitación y sorción en partículas de materia orgánica y arcillas del suelo. El éxito de cada proceso de atenuación natural dependerá de las características geológicas, hidrológicas y microbiológicas de la zona afectada (Yong y Mulligan, 2004; Aburto-Medina y col. 2012).

Las reacciones y transformaciones que tienen lugar durante los procesos abióticos dependen de las propiedades físico-químicas del contaminante y del suelo y, tanto para sustancias inorgánicas

como orgánicas, incluyen reacciones de hidrólisis y oxidación-reducción, formación de dobles enlaces y deshidrohalogenación.

La atenuación natural se aplica principalmente para tratar compuestos BTEX (benceno, tolueno, etil benceno y xileno) (Kirtland y col. 2000; Kao y Prosser, 2001) y más recientemente hidrocarburos clorados (Nobre y Nobre, 2004). Otros contaminantes que pueden ser potencialmente eliminados incluyen plaguicidas (Sorensen y col. 2006) y compuestos inorgánicos (Lin y Puls, 2003).

Para que la atenuación natural sea segura, es absolutamente necesario realizar una monitorización constante durante todo el tiempo que estos procesos naturales estén actuando con objeto de eliminar riesgos para el medio ambiente y la salud humana. Para ello, resulta muy útil la realización de modelos que puedan predecir el comportamiento y transporte de los contaminantes (Yong y Mulligan, 2004).

A.1.2. Biodegradación asistida

Cuando la biodegradación no se puede llevar a cabo de forma natural porque los microorganismos no disponen de los elementos esenciales para ello en la zona contaminada, se requiere la intervención de actuaciones ingenieriles encaminadas a estimular la actividad microbiológica. Así, la biodegradación asistida acelera las reacciones de biodegradación facilitando el crecimiento microbiano y optimizando las condiciones medioambientales de la zona donde los microorganismos deben llevar a cabo su función de descontaminación. Para que esta aproximación funcione, el contaminante no debe ser recalcitrante, es decir, los microorganismos deben tener la capacidad genética y fisiológica suficiente como para degradar la sustancia.

Fundamentalmente, la estimulación de la actividad microbiana natural, conocido como *bioestimulación*, se realiza mediante el control de parámetros como el potencial redox y las condiciones de humedad, y la adición de oxígeno u otros aceptores de electrones (como nitrato o sulfato) y nutrientes tales como el nitrógeno y el fósforo (Thompson y col. 2005; Tyagi y col. 2011). Cuando se estimula artificialmente la biodegradación *in situ* cerca de la superficie, se utilizan galerías de inyección que permitan la infiltración en los suelos de agua enmendada con donadores de electrones y/o nutrientes. En la Figura 1.8 se esquematiza la biorrecuperación asistida. Cuando la contaminación es más profunda, se emplean sistemas de inyección a través de pozos (Bouwer y cols. 1998). Algunos sistemas de biodegradación *in situ* utilizan la acción combinada de pozos de inyección y extracción para controlar el flujo de aceptores de electrones y nutrientes y para aislar hidráulicamente la zona contaminada. También se pueden crear zonas de reacción biológica adicionando aceptores y donadores de electrones y/o nutrientes para estimular la biodegradación.

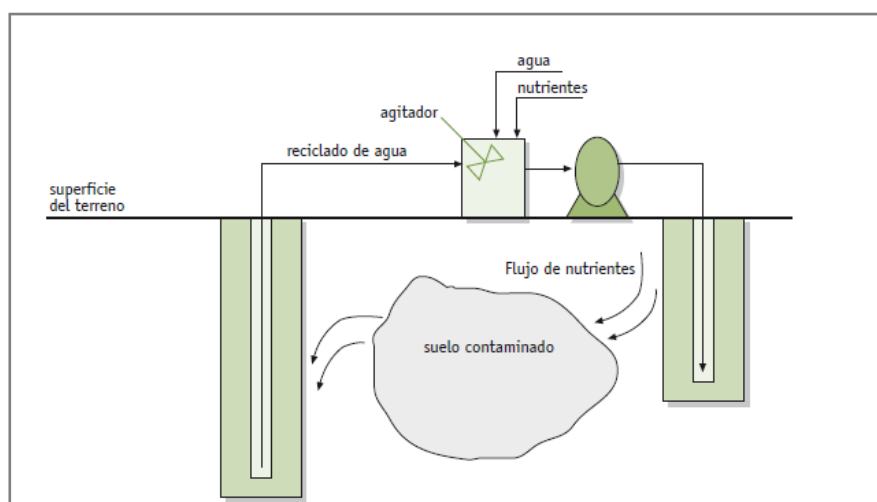


Figura 1.8. Esquema de biorrecuperación asistida.

En la literatura se pueden encontrar numerosos estudios de biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos. Así, a modo de ejemplo, hay diversos trabajos que muestran la biodegradación aerobia (Kästner y col. 1994; Bastiaens y col. 2000; Johnsen y col. 2002; Potin y col. 2004) y anaerobia (McNally y col. 1998; Jonhson y Ghosh, 1998; Rockne y col. 2000) de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelos. También se han estudiado la biodegradación de clorofenoles y derivados fenólicos utilizados como herbicidas y pesticidas (Kao y col. 2004; Baggi y col. 2004; Nieman y col. 2005; Mahmood y col. 2005; Shibata y col. 2006); o la biodegradación de otros hidrocarburos monoaromáticos como el tolueno, etilbenceno y xileno por bacterias (Jahn y col. 2005; Villatoro-Monzón y col. 2003; Attaway y Schmidt, 2002) y hongos del suelo (Prenafeta-Boldu y col. 2002; Prenafeta-Boldu y col. 2004; Nikolova y Nenov, 2005; Ellegaard-Jensen y col. 2013, 2014).

En el caso de que las comunidades microbianas autóctonas no sean capaces de biodegradar los compuestos orgánicos tóxicos, se pueden adicionar al suelo microorganismos específicos que sí lo lleven a cabo, un proceso conocido como *bioaumentación* (Ghazali y col. 2004; El Fantroussi y Agathos, 2005; Thompson y col. 2005; Mrozik y col. 2010; Tyagi y col. 2011). El bioaumentación incluye la estimulación de las comunidades microbianas autóctonas y su posterior reinyección en la zona contaminada, es decir, consistiría en la adición de microorganismos no indígenas al suelo que sean capaces de biodegradar o cometabolizar los compuestos contaminantes, así como la adición de microorganismos modificados genéticamente con genes catabólicos adicionales específicos para degradar (Show y Hicks, 2005; de Carvalho y da Fonseca, 2005; Khomenkov y col. 2008).

Un obstáculo en el diseño de organismos modificados genéticamente (OMGs) son los problemas burocráticos a la hora de obtener permisos para utilizarlos en el medio ambiente, más que las

limitaciones a la hora de realizar las modificaciones genéticas (Romantschuk y col. 2000). Para eliminar los riesgos asociados con el uso y actividad de los OMGs en el medio ambiente, algunos autores han diseñado incluso estrategias de muerte celular para programar estos microorganismos para que se suiciden después de realizar la descontaminación (Ronchel y col. 1998). En cualquier caso, el uso en biodegradación de OMGs es un amplio campo todavía por explorar y aún no está siendo utilizado en ensayos de biorrecuperación *in situ* a gran escala.

Recientemente, el uso conjunto de la biodegradación y otras técnicas de recuperación de suelos está abriendo nuevos campos de aplicación. Así, la bioelectrocinética es una técnica que trata de mejorar la biodegradación *in situ*. Consiste en favorecer la entrada en contacto del contaminante orgánico con las bacterias degradadoras (Luo y col. 2006) o introducir aditivos que potencien la biodegradación como nutrientes, donadores y aceptores de electrones, agentes quelantes, etc. (Acar y col. 1997; Saichek y Reddy, 2003; Luo y col. 2004), mientras que se aplica una corriente eléctrica *in situ* en el suelo contaminado.

A.1.3. Fitorrecuperación

La *fitorrecuperación* es una técnica emergente que utiliza la capacidad de ciertas especies vegetales para sobrevivir en ambientes contaminados con sustancias orgánicas y a la vez extraer, acumular, inmovilizar o transformar estos contaminantes del suelo, ya que segregan enzimas que actúan como surfactantes aumentando la biodisponibilidad (Tejada-Agredano y col. 2013); además existen interacciones sinérgicas entre plantas y microorganismos en la rizosfera que aumentan la degradación de contaminantes orgánicos (Wang y col. 2013). El éxito de este tratamiento está controlado por la selección de las especies vegetales adecuadas para recuperar un suelo determinado, así como de la cuidada selección de enmiendas que permiten mejorar las propiedades del suelo y fomenten la supervivencia y el desarrollo de las plantas (Clemente y col. 2005).

La *fitorrecuperación* es un tratamiento natural, limpio y económico, alternativo a otros procesos físicos y químicos más invasivos. De acuerdo con Wenzel y col. (1999), se pueden distinguir cinco procesos básicos de contención (fitoestabilización o fitoinmovilización) o eliminación (fitoextracción, fitodegradación, fitovolatilización y rizofiltración) de contaminantes por los que las plantas pueden ser empleadas en la recuperación de suelos y aguas contaminadas.

A.1.4. Bioventing

El *bioventing* es una técnica *in situ* de recuperación biológica que implica la inyección a través de pozos de aire (u oxígeno) y, si es necesario, también de nutrientes para estimular la actividad microbiana biodegradadora (Mihopoulos y col. 2001). Este tratamiento utiliza los

microorganismos indígenas para biodegradar compuestos orgánicos adsorbidos en los suelos de zonas no saturadas (Mihopoulos y col. 2002).

A.2. Procesos *ex situ*

A.2.1. *Landfarming* y *Biopilas*

Son dos tratamientos de recuperación biológica que consisten en la excavación de suelos contaminados y en la estimulación de la actividad de microorganismos mediante nutrientes y humedad. En las *biopilas*, el sistema de aireación se realiza forzando la circulación de aire con la ayuda de un compresor o mediante extracción a través de conductos perforados emplazados dentro de la pila. En el caso de la técnica agraria (*landfarming*) la aireación se consigue arando el terreno (Sparks y Corn, 1993). Las áreas de tratamiento se suelen cubrir para prevenir la escorrentía, la evaporación y la volatilización y para promover el calentamiento por el sol. Estas técnicas se emplean para descontaminar suelos con compuestos derivados del petróleo, también se pueden utilizar para compuestos orgánicos volátiles halogenados y no halogenados, compuestos orgánicos semivolátiles y plaguicidas (Mohn y col, 2001; Li y col. 2004; Plaza y col. 2005).

A.2.2. *Compostaje*

El compostaje es un proceso biológico que consiste nuevamente en estimular la actividad biodegradadora, aerobia y/o anaerobia, de microorganismos indígenas bajo condiciones termofílicas (12-18 °C) que permita transformar compuestos orgánicos tóxicos en sustancias inocuas (USEPA, 1996). Para ello, los suelos contaminados son excavados y mezclados con residuos animales y vegetales como abonos, estiércol, paja, trozos de madera, etc. que proporcionan una porosidad óptima y un balance adecuado de carbono y nitrógeno. El calor generado metabólicamente con este proceso es atrapado dentro de la matriz del compost, lo que da lugar a la elevación de la temperatura característica del compostaje (Williams y col. 1992). Una vez que se ha realizado la descomposición microbiana, se produce un efecto de enfriamiento debido al descenso de la actividad microbiana cuando todo el carbono orgánico presente ha sido utilizado. El compostaje termofílico aeróbico se ha visto que es eficaz para reducir la concentración de explosivos (Williams y col. 1992, Breitung y col. 1996; Esteve-Núñez y col. 2001; Thorn y Kennedy, 2002), hidrocarburos aromáticos policíclicos y pesticidas (Naidu y col. 2008).

1.3.4. Estimación del riesgo tóxico

Actualmente, existe un interés científico en encontrar técnicas químicas capaces de predecir la biodisponibilidad a largo plazo de residuos de compuestos orgánicos contaminantes. El principal objetivo de la cuantificación de la biodisponibilidad consiste en poder predecir hasta qué punto el

empleo de estrategias microbiológicas para la recuperación de suelos contaminados serán efectivas. Como resultado, numerosas técnicas químicas se han investigado y ensayado con el objetivo de medir la biodisponibilidad de un compuesto tóxico (Cuypers y col. 2002; Doick y col. 2005; Mordaunt y col. 2005; Reichenberg y Mayer, 2006; Rhodes y col. 2008). La mayoría de los estudios han preferido el uso de diferentes técnicas de extracción, las cuales han sido divididas en exhaustivas y no exhaustivas. Las técnicas exhaustivas ofrecen una sobreestimación de la toxicidad real, tanto en laboratorio como en estudios de campo, ya que todo el contaminante es extraído y no sólo la fracción que es realmente biodisponible (Papadopaulus y col. 2007; Hofman y col. 2008; Rhodes y col. 2008). Por lo tanto, una estimación de riesgo tóxico debe ser optimizada a través del empleo de técnicas de extracción que intenten determinar únicamente la concentración de contaminante biodisponible (ISO 17402:2011).

Las extracciones no exhaustivas pretenden extraer la fracción lábil del contaminante (disuelta, de desorción rápida y parte de la fracción que se desorbe más lentamente) (Reid y col. 2000). Diferentes técnicas exhaustivas de extracción han sido desarrolladas y empleadas convencionalmente usando soxhlets (Villaverde y col. 2008), ultrasonidos (Petrovic y col. 2005) o EAD (extracción acelerada con disolvente) empleando diferentes disolventes orgánicos como diclorometano, hexano, tolueno, etc. Por otro lado, las técnicas no exhaustivas se consideran como técnicas de extracción acuosas, ej: utilizando agua destilada, soluciones de cloruro cálcico y más recientemente soluciones de ciclodextrinas (CDs). La biodisponibilidad de compuestos tóxicos para los microorganismos es, en general, mayor que para humanos, animales o plantas (Alexander, 1995), y por lo tanto, incluso la cantidad de contaminante extraída empleando técnicas no exhaustivas de extracción podría sobreestimar el riesgo potencial de estos contaminantes hacia organismos vivos, como plantas, en el caso de plaguicidas.

Nuevas aproximaciones para la estimación real del riesgo tóxico de contaminantes han sido publicadas por Harmsen, (2007), donde el desarrollo de bioensayos se postula como un experimento esencial para establecer dicha estimación. Por lo tanto, para establecer la potencial biodisponibilidad de un contaminante, es necesario definir el sistema en su totalidad (ej: el suelo, tipo de microorganismos, condiciones medioambientales que puedan influir en el comportamiento del contaminante, así como la actividad microbiana), concluyéndose que se deberán establecer correlaciones entre la disponibilidad medioambiental, obtenida por métodos químicos y la biodisponibilidad, así como el efecto tóxico en los organismos.

1.4. CICLODEXTRINAS

1.4.1. Definición, obtención y estructura química

Las ciclodextrinas (CDs) se pueden definir como oligosacáridos cíclicos constituidos por un número variable de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,4). Estas moléculas son capaces de formar complejos de inclusión con numerosos productos, debido a su conformación toroidal o de “donut”, que delimita una cavidad relativamente apolar, mientras que el exterior presenta una naturaleza hidrofílica, pudiendo formar compuestos de inclusión tanto en medio líquido como en estado sólido y solubilizar moléculas hidrofóbicas de tamaño compatible con su cavidad (Morillo y col. 2012).

Las CDs son compuestos naturales, no tóxicos e inocuos para los microorganismos, y de ahí que tengan gran uso en aplicaciones farmacológicas. Las CDs son producidas por la acción de la enzima CD glicosiltransferasa (CGT) en un medio que contenga almidón. El producto primario de la rotura por la CGT experimenta una reacción intramolecular dando lugar a productos finales cíclicos, por medio de enlaces α -(1,4).

La nomenclatura de las CDs se realiza por medio de letras griegas para denotar el número de unidades de D-glucosa: α para las de 6 unidades, β para las de 7, γ para las de 8 y así sucesivamente para CDs superiores. Se puede llegar a encontrar CDs con un mayor número de subunidades de D-glucosa, pero estas presentan dificultades, tanto para su purificación como para su posible complejación con otras moléculas. Por otro lado, las CDs con un número inferior a 6 unidades no se pueden aislar debido a impedimentos estéricos.

En cuanto a la estructura química, como consecuencia de la conformación del C₁ de las unidades de α -D-glucopiranososa y la ausencia de libre rotación en los enlaces glucosídicos, estas moléculas no son totalmente cilíndricas, sino que presentan una conformación troncocónica. Los grupos hidroxilos secundarios (ligados a los átomos C₂ y C₃ de las unidades de glucosa) y los hidroxilos primarios se encuentran situados, cada uno, en los polos opuestos de la molécula, siendo más estrecho el lado donde se encuentran los hidroxilos primarios, confiriendo a la molécula una estructura hidrofílica en el exterior de la misma. La libre rotación de los hidroxilos primarios, debido a que no se encuentran rodeados por átomos de hidrógeno, puede ser la responsable de la reducción del diámetro efectivo por donde esto ocurra, mientras que los hidroxilos secundarios, situados en cadenas más rígidas, no tendrían esa posibilidad.

Los hidroxilos secundarios pueden formar puentes de hidrógeno entre sí, concretamente entre el hidroxilo secundario portado por el C₂ y el hidroxilo secundario portado por el C₃ del residuo glucopiranosil adyacente. Por lo tanto, en las CDs se puede formar un cinturón completo de

uniones de hidrógeno, siendo responsable de la formación de una estructura rígida, tal y como ocurre con la β -CD.

Esta estructura, así estabilizada, permite una orientación particular de los protones libres H_1 , H_2 , H_3 , H_4 , H_5 (soportados por C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5). Los H_1 , H_2 y H_4 , se encuentran dirigidos hacia el exterior, mientras que los H_3 y H_5 lo están hacia el interior de la cavidad.

La cavidad de la CD consiste en un anillo de átomos de hidrógeno aportados por los C_3 , otro anillo de oxígenos aportados por los enlaces glucosídicos y por un último anillo de átomos de hidrógeno aportados por los C_5 . Por esta razón, la cavidad presenta un carácter apolar. Las principales propiedades de las CDs naturales se recogen en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. *Propiedades de las ciclodextrinas naturales.*

CAVIDAD	α	β	γ
Diámetro interior (Å)	4,7-5,3	6-6,5	7,5-8,3
Diámetro exterior (Å)	14,6	15,4	17,5
Profundidad (Å)	7,9	7,9	7,9
Volumen (Å³)	174	262	427
Peso molecular	972	1135	1297
Solubilidad (*)	14,5	1,85	23,2

(*) En gramos por 100 mL de agua a temperatura ambiente.

La CD empleada en esta Tesis principalmente fue la 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD). El objetivo principal de la hidroxipropilación de las CDs ha sido la de aumentar la solubilidad acuosa del producto de partida, simultaneando las ventajas de un derivado hidrosoluble y una estructura amorfa.

1.4.2. Complejos de inclusión con ciclodextrinas

1.4.2.1. Concepto

En general, los complejos de inclusión son compuestos moleculares que presentan la estructura característica de un clatrato, en los que la molécula hospedadora envuelve a otra. De este modo, el compuesto incluido (molécula huésped), se encuentra situado en la cavidad del hospedador, sin verse afectada de manera significativa su estructura. Aparte de la leve deformación, un hecho característico es que el tamaño y la forma de la cavidad disponible permanecen prácticamente inalterados. Los compuestos de inclusión resultantes pertenecen a los complejos del tipo “hospedador-invitado”.

La formación de los compuestos de inclusión con CDs se divide en 5 etapas, que se presentan en la Figura 1.9 y se describen a continuación.

- I. Ruptura de las moléculas de agua del interior de la cavidad de la CD con salida de algunas moléculas de agua fuera del anillo.
- II. Desorden de la estructura del agua alrededor de la molécula que va a ser incluida y transporte de algunas moléculas de agua hacia la solución.
- III. Interacción de la molécula del sustrato o de algunos de sus sustituyentes con grupos del borde o del interior de la cavidad de la CD.
- IV. Formación de posibles puentes de hidrógeno entre el sustrato y la CD.
- V. Restablecimiento de la estructura del agua alrededor de la parte exterior de la molécula de CD después de la inclusión.

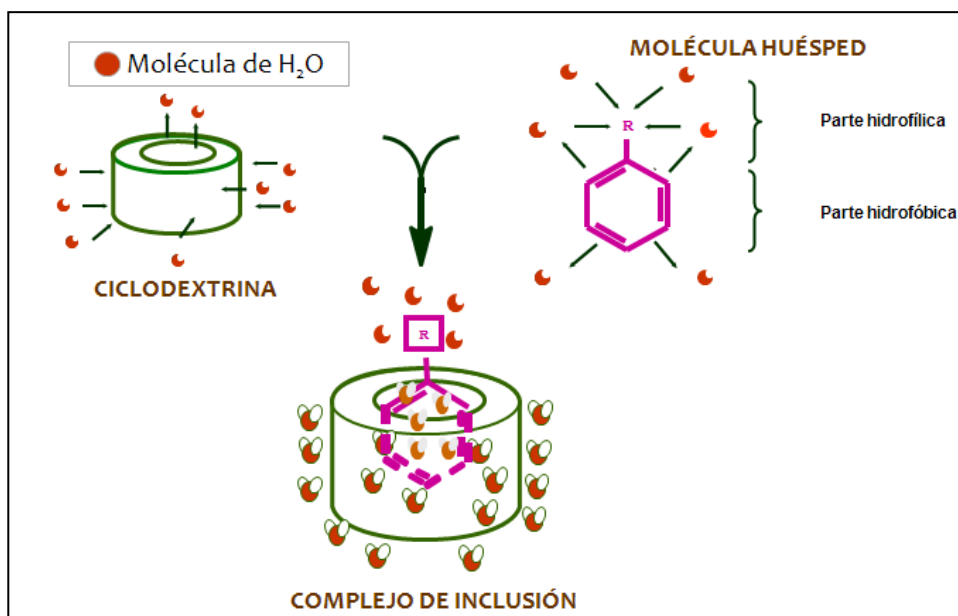


Figura 1.9. Esquema de la formación de un compuesto de inclusión con CD.

Es importante señalar que la fase de formación de puentes de hidrógeno nunca va a constituir un paso limitante en el proceso de formación del complejo de inclusión, debido a que se forman de una manera extremadamente rápida. La formación del complejo de inclusión se establece mediante uniones no covalentes sustrato-ligando, tales como Van der Waals, electrostáticas, de inducción o polarización y de dispersión o de London.

1.4.2.2. Requerimientos para la formación de complejos de inclusión

Para que se forme un complejo de inclusión deben tenerse en cuenta una serie de requisitos, los cuales se enumeran a continuación.

1) Factores estéricos

Se trata de un factor limitante en la formación del complejo puesto que el tamaño de la molécula huésped determinará la inclusión, parcial o total de la misma, en la cavidad de la CD. De las diferentes etapas para la formación del complejo las etapas de aproximación e interacción están claramente influenciadas por la compatibilidad geométrica entre la CD y la molécula huésped. Una buena acomodación de la molécula huésped al tamaño de la cavidad de un tipo concreto de CD conducirá a un mayor número de interacciones entre ambas moléculas, hecho que conduce a un valor más elevado para la constante de estabilidad del complejo. Sin embargo, también puede darse la formación del complejo de inclusión con la sola penetración de ciertos grupos o cadenas laterales de dichas moléculas dentro de la cavidad de la CD (Villaverde y col. 2005b).

Además de CDs naturales, se han sintetizado algunos derivados mediante modificaciones en el anillo formado por los grupos hidroxilos. Los derivados más comunes se han obtenido a partir de β -CD, la cual se modifica de forma química para incrementar su solubilidad en agua y otras propiedades.

De todo ello se puede concluir fácilmente, teniendo en cuenta las dimensiones de las cavidades de las CDs, que las moléculas o radicales de bajo peso molecular podrán formar complejos estables con la α -CD (Bardi y col. 2000; De Jesús y col. 2006), y del mismo modo moléculas de alto peso molecular con mayor número de ramificaciones lo harán con CDs de mayor cavidad como la β y en especial la γ -CD (Charoenchaitrakool y col. 2002). En algunos casos se han detectado moléculas cuya complejación está dificultada por el uso de derivados de CDs (Jullian y col. 2007). En este caso lo que aparecen son impedimentos estéricos debidos a los radicales de la propia CD.

2) Medio

En principio, no es necesario ningún tipo de disolvente para que se pueda formar un compuesto de inclusión. Por ejemplo, mezclando β -CD cristalina finamente pulverizada con ácido salicílico pulverizado y almacenándolos varios meses en un recipiente cerrado, a temperatura ambiente, se forma espontáneamente un compuesto de inclusión de estequiometría 1:1. Con “moléculas huésped” no sublimables, este proceso no es posible llevarlo a la práctica, al resultar demasiado lento.

El proceso de complejación se ve favorecido en presencia de agua. La formación de complejos en solución es un proceso muy rápido; sin embargo, sustancias que posean buena solubilidad son complejadas débilmente, por regla general. En cambio, las moléculas que presenten una buena complejación suelen poseer una baja solubilidad en agua.

En la preparación de los complejos de inclusión en medio líquido se pueden diferenciar claramente dos etapas. En la primera fase, es necesario que el compuesto orgánico pase del estado sólido a la solución acuosa que contiene la CD, es decir que se solubilice. La segunda fase consiste en la formación del complejo de inclusión tras un proceso de equilibrio.

Generalmente, la presencia de disolventes orgánicos no es deseable, pero muchas veces es inevitable. Moléculas huésped muy poco solubles no pueden ser complejadas en una concentración o tiempo aceptable sin acudir al empleo de estos disolventes. Muchas veces, estos disolventes no pueden ser eliminados en su totalidad, pues forman parte integral del producto en forma de complejo disolvente-CD, o bien como compuesto ternario (disolvente-huésped-CD) ligado a la cavidad de la CD, junto al huésped principal.

3) Polaridad y carga

Partiendo de la idea de que la naturaleza de la cavidad de la CD es hidrófoba es fácil pensar que las especies o radicales menos iónicos y de carácter hidrófobo darán lugar a la formación de complejos de inclusión más estables en solución acuosa, favoreciéndose la aparición de fuerzas de interacción entre ambas moléculas de tipo hidrófobo, las cuales son las principales responsables de la formación del complejo. De esta forma, moléculas fuertemente hidrófilas y grupos fuertemente hidratados e ionizados no son o son débil y/o parcialmente complejables.

Por último, hay que tener en cuenta que fuerzas cohesivas demasiado fuertes entre moléculas impiden su separación, lo cual es una precondition para la inclusión. Una medida de la cohesión entre las moléculas de una sustancia cristalina lo va a dar el punto de fusión del compuesto, por lo que productos con un punto de fusión superior a 250 °C no conducen a compuestos de inclusión estables.

1.4.2.3. Métodos de estudio de complejos de inclusión en solución

- Estudios de solubilidad

Todos ellos se rigen por un principio general; se basan en el análisis por un lado del compuesto orgánico y de la ciclodextrina independientemente, y por otro, en el análisis del complejo formado. Las modificaciones observadas son las que confirman la posible formación del complejo de inclusión por interacciones entre sus moléculas.

Este método fue el propuesto por Higuchi y Connors, (1965). Se basa en la observación del cambio de solubilidad que presenta un sustrato a lo largo de la adición del agente complejante. La molécula de sustrato se irá añadiendo a soluciones de concentraciones crecientes de CDs, bajo condiciones de agitación y temperatura constantes. Tras dejarlos un tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio, se realizarán medidas de las concentraciones del sustrato disuelto.

Finalmente, se representan las concentraciones de sustrato disuelto frente a las concentraciones crecientes de CDs. Los diagramas de solubilidad obtenidos se clasifican en diferentes tipos, los cuales se muestran en la Figura 1.10.

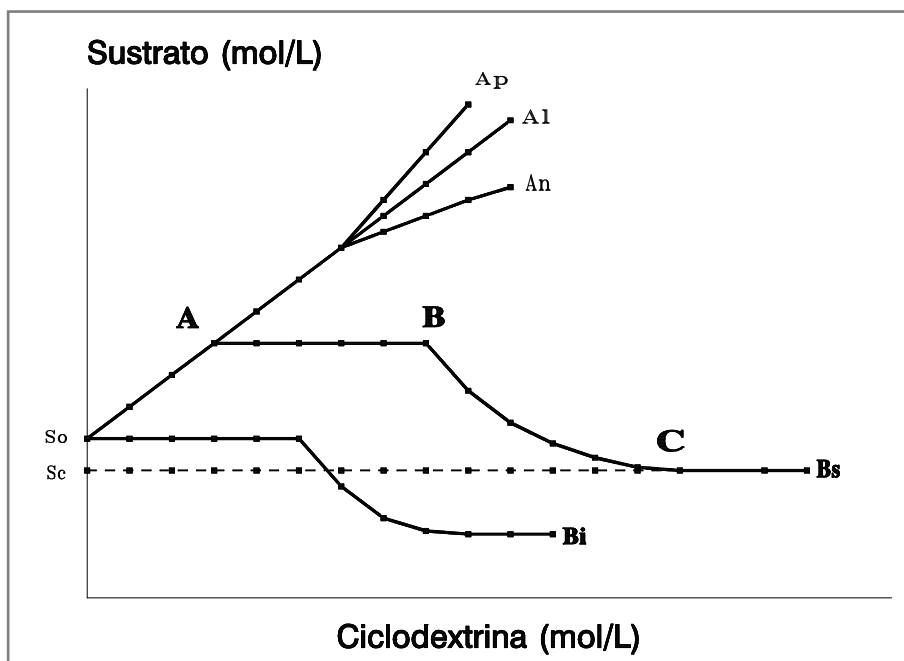


Figura 1.10. Representación de los distintos tipos de diagramas de solubilidad existentes (S_c : solubilidad límite del complejo poco soluble. S_0 : solubilidad de la molécula huésped).

- **Tipo A:** Si la solubilidad del complejo es ilimitada. Aparece un complejo soluble donde la concentración del sustrato aumenta con la concentración de la CD. Las curvas del tipo A pertenecen a alguno de estos subtipos:

A_L : Se trata de un complejo de inclusión con estequiometría 1:1.

A_P : El complejo posee una estequiometría superior a la proporción 1:1.

A_n : Este tipo de curvas son más difíciles de interpretar pues las interacciones soluto/soluto y solvente/soluto complican el sistema.

- **Tipo B:** se obtiene cuando la solubilidad del complejo es limitada, es decir, que posee un límite de solubilidad a partir del cual precipita. Existen dos subtipos:

B_i : En este caso se forma el complejo de inclusión, pero este no es soluble, no existiendo mejora en la solubilidad de la molécula huésped.

B_s : El complejo se forma y nos aporta una mejora en la solubilidad del huésped. En el punto A la solubilidad del complejo alcanza su límite y las posteriores adiciones de CD conducen a su precipitación. La concentración de sustrato permanece constante en el tramo de A hasta B

debido a la disolución del sustrato sólido remanente, hasta que todas las moléculas de éste forman un complejo insoluble, por la creciente adición de CD, precipitando en un complejo.

En algunas ocasiones se ha podido observar un aumento de solubilidad a partir del punto C causado por la formación de un nuevo complejo de inclusión.

A partir de los diagramas de solubilidad se puede calcular la constante de estabilidad del complejo de inclusión y su estequiometría, así como la eficacia solubilizante de la ciclodextrina empleada, tal como se verá en el apartado 3.2.3 de Materiales y Métodos. Estas constantes fueron obtenidas mediante la ecuación propuesta por Higuchi y Connors (1965).

- Espectrofotometría ultravioleta

Mediante esta técnica se puede obtener información sobre la formación del complejo, observándose, en caso afirmativo, un desplazamiento espectral debido a la formación de complejo con CD. La presencia de un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción de la sustancia a encapsular, acompañado de una ligera disminución de la intensidad de dicho máximo de absorción, es indicativo de la presencia de un compuesto de inclusión (Ventura y col. 1994; Zhang y col. 2009).

- Resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN)

La espectroscopía de ^1H -RMN es una de las técnicas más útiles de las que se dispone hoy en día para la confirmación de estequiometría, estabilidad y geometría de los complejos de inclusión obtenidos, proporcionando una información directa sobre la formación del complejo. La principal ventaja de esta técnica es que en el proceso de la inclusión están implicados los núcleos de los átomos, pudiéndose dilucidar los átomos que se encuentran directamente implicados en las interacciones entre la molécula huésped y la CD (Pérez-Martínez. y col. 2000a y b).

La técnica, aplicada a la determinación de la formación de complejos de inclusión con CDs, se basa en la detección del desplazamiento de ciertos picos en el espectro del complejo respecto al espectro de las sustancias participantes por separado, provocado por la participación de los átomos de hidrógeno en la formación de los puentes de hidrógeno entre ambas moléculas. Se verán afectados por un lado, los átomos de hidrógeno localizados en el interior de la cavidad (C3-H y C5-H) y por otro lado, aunque en menor medida, aquellos situados en el exterior de la cavidad de la CD (C2-H, C4-H, C6-H).

La estequiometría de los complejos de inclusión puede calcularse mediante la técnica de los puntos de Job (Job, 1928), donde se representa la variación de los valores de desplazamiento químico para un determinado protón (H3 y H5 en el caso de la CD), frente a la fracción molar del huésped en una disolución compuesto orgánico-CD. La estequiometría del compuesto de

inclusión vendrá establecida en el punto de variación máximo, que se corresponde con una fracción molar determinada. Finalmente la constante de estabilidad, también puede ser determinada mediante la aplicación de la ecuación de Scott (1956).

1.4.2.4. Recuperación de suelos contaminados por plaguicidas mediante la aplicación de ciclodextrinas

Algunos plaguicidas orgánicos hidrofóbicos se adsorben fácilmente en el suelo, disminuyendo de esta forma su efectividad y dificultándose la recuperación de sus residuos del suelo. Ciertos disolventes orgánicos y surfactantes han sido considerados para mejorar la solubilidad de estos plaguicidas, pero ambos presentan desventajas desde un punto de vista medioambiental. Como alternativa, las ciclodextrinas pueden tener un uso potencial como agentes que aumentan la solubilidad (Fenyvesi y col. 1996). En general la aplicación de ciclodextrinas en el campo de los plaguicidas es muy modesta, representando menos del 1% de la literatura sobre ciclodextrinas, y sólo muy pocos de estos estudios tratan sobre solubilización y recuperación de plaguicidas de suelos usando CDs (Morillo, 2006; Villaverde y col. 2005a, b, 2006, 2007). La complejación del herbicida 2,4-D, uno de los más comúnmente usados en todo el mundo, con β - y HP- β -ciclodextrinas condujo a la eliminación del suelo de este herbicida (Pérez-Martínez y col. 1999, 2000a y b), y su completo lixiviado de los suelos se observó mediante la aplicación de una solución de β -CD en columnas de suelo (Morillo y col. 2001). Norflurazona es otro herbicida que presenta algunos problemas desde el punto de vista agrícola y medioambiental, como es la larga persistencia de sus residuos en algunos tipos de suelos. Estudios de desorción del herbicida Norflurazona de suelos en presencia de α - y γ -ciclodextrinas mostraron que ambas efectivamente aumentaban la eliminación de norflurazona previamente adsorbida, probando así su uso potencial para la recuperación *in situ* de los suelos contaminados con plaguicidas (Villaverde y col. 2005a y b; Villaverde y col. 2007).

También la adsorción del diclofop-metilo en el suelo se vio drásticamente reducida en presencia de un derivado sintético de β -CD, (Cai y col. 2005). Se trata de un herbicida que se encuentra asociado a las partículas atmosféricas que se depositan con la lluvia y el polvo. Su movilidad en suelos es ligera o nula. Prácticamente no se lixivia, ni se mueve. El aumento de la solubilidad en agua del plaguicida implica una más rápida y fácil liberación del mismo en la solución del suelo. Este hecho, a su vez, conlleva la reducción del uso de disolventes orgánicos (la mayoría de las moléculas de plaguicida son compuestos apolares, hidrófobos), reduciendo la contaminación por los mismos, además de suponer un ahorro desde el punto de vista económico. Debido al aumento de la solubilidad que provoca este tipo de encapsulaciones podemos conseguir su liberación, por acción de la lluvia. Ha sido posible aislar complejos CDs - plaguicidas tanto en

forma sólida como en solución. Oliver y col. 1993 determinaron la formación de complejos de inclusión de β -CD con los insecticidas aldicarb y sulfopros. Pérez-Martínez y col. (1999) confirmaron la formación del complejo de inclusión entre la β -CD y el herbicida 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)- Pérez-Martínez y col. (2000) también realizaron un estudio de caracterización de complejos entre la β -CD y 2,4-D. Pérez-Martínez y col. (1999) determinaron mediante análisis térmico (DSC HSM), la formación del complejo de inclusión 2,4-D y α -CD. Lezcano y col. (2002) confirmaron la formación de complejos de inclusión en solución con β -CD de tres fungicidas, tiabendazol, carbendazim y fuberidazol, determinando la estequiometría de los complejos (1:1) a través de diagramas de solubilidad tipo A_L .

Por otro lado, desde un punto de vista de la recuperación de plaguicidas en suelos se han conseguido importantes efectos a partir de la encapsulación molecular con CDs, como son la mejora en la desorción de plaguicidas (Fuoco y Colombini, 1994). Pérez-Martínez y col. (2000a y b) comprobaron cómo el herbicida 2,4-D fue desorbido empujando soluciones de β -CD. Morillo y col. (2001) observaron cómo en un suelo previamente tratado con β -CD, se producía una disminución de la lixiviación de 2,4-D y cómo por el contrario se conseguía un aumento de su lixiviación si la solución de CD se aplicaba después de haber sido adsorbido el herbicida en suelo. Villaverde y col. (2006) pusieron de manifiesto el gran efecto que ejercen las CDs para aumentar la desorción de norflurazona, así como su potencial aplicación a la descontaminación de suelos. Otros estudios importantes son los relacionados con el efecto de algunos componentes del suelo a la hora de la formación del complejo de inclusión. Ishiwata y Kamiya (1999) han llevado a cabo estudios sobre la influencia de las sustancias húmicas a la hora de la formación del complejo de inclusión con la molécula de plaguicida, demostrando su efecto inhibitorio.

Respecto a la influencia del complejo de inclusión en la fotodegradación química de los plaguicidas, se han llevado a cabo diversos estudios sobre el posible efecto fotoprotector que pudieran ejercer las CDs sobre los plaguicidas. La importancia de este hecho radica en el efecto que la luz ejerce sobre la permanencia del plaguicida y de sus metabolitos en el medioambiente. Kamiya y Nakamura (1995) observaron, mediante el estudio estructural del complejo de inclusión con la β -CD, una inhibición en la fotodegradación de paratión y paraoxón en función de la proximidad de los centros catalíticos de la CD y los centros reactivos de la molécula de herbicida. Por el contrario Ishiwata y Kamiya (1999) observaron que en presencia de sustancias húmicas estos complejos de inclusión con CDs ejercían un efecto inductor sobre la fotodegradación de varios plaguicidas organofosforados. La fotodegradación de norflurazona aumenta cuando existe montmorillonita o goetita en suspensión, pero la presencia de β -ciclodextrina en solución protege al herbicida, haciendo que su degradación disminuya. Las sustancias húmicas en

suspensión protegen al herbicida de su fotodegradación, pero sólo en las primeras horas de irradiación (Villaverde y col. 2005a).

En base a las propiedades de formulaciones de plaguicidas en estado sólido se han conseguido importantes mejoras mediante la encapsulación con CDs, como la mejora del flujo, aumento de la humectabilidad y de la estabilidad térmica respecto a las moléculas iniciales (Szejtli, 1998). Szente (1998) comprobó estas mejoras mediante la encapsulación molecular de varios plaguicidas organofosforados (malation, sumithion, clorpirifos y sulfopros) con β -CD. En algunos casos logran suprimir las cualidades organolépticas desagradables de este tipo de sustancias, como el mal olor de los mismos (Szejtli, 1988).

Como ya se indicó anteriormente uno de los factores más importantes a la hora de formarse un compuesto de inclusión entre una CD y una molécula huésped es el factor estérico (tamaño de la cavidad de la CD y de la molécula huésped), de ahí que se hayan llevado a cabo diversos estudios enfocados a determinar el grado de importancia de este factor a la hora de formarse un complejo de inclusión entre una molécula de plaguicida y la CD. Fuoco y Colombini (1994) comprobaron la formación de un complejo de inclusión entre el herbicida difenzoquat y la β -CD al mismo tiempo que observaron que la inclusión del herbicida con las otras CDs naturales (α - y γ -CD) resultó ser insignificante. Isiwata y Kamiya, (2000) realizaron estudios sobre la profundidad alcanzada en la inclusión de los herbicidas paration y malation en la cavidad de la β -y γ -CD.

A lo largo de esta introducción han quedado ampliamente demostradas las ventajas de las propiedades que tienen las ciclodextrinas en su aplicación como agentes extractantes para mejorar la biodisponibilidad de contaminantes hidrofóbicos en suelos y su consecuente biodegradación, pero parece que todavía el precio de la técnica más económicamente viable usando β -CD (la más barata), es aún alto para llevar a cabo un uso más amplio. Esta es la razón de que muchos de los trabajos comentados anteriormente hayan sido examinados en suelos contaminados en el laboratorio y no sean directamente aplicados en estudios *in situ* (McCray y Brusseau, 1998; Molnár y col. 2005; Bardi y col. 2007). A pesar de ello, muchos autores consideran el tratamiento de suelos con ciclodextrinas como una prometedora tecnología de recuperación que será desarrollada en el futuro.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En la presente Tesis Doctoral se pretende desarrollar una técnica de recuperación de suelos contaminados por compuestos orgánicos persistentes, tales como los plaguicidas organoclorados debido a su impacto medioambiental, basada en el uso de cepas bacterianas degradadoras específicas y soluciones de nutrientes esenciales y ciclodextrinas. La capacidad de las ciclodextrinas para formar complejos de inclusión con compuestos hidrofóbicos provoca un aumento en su hidrosolubilidad, incrementando la concentración de estos en la solución del suelo y por lo tanto su biodisponibilidad para ser degradados por los microorganismos.

Se ha seleccionado de acuerdo con la bibliografía, un herbicida que se detecta frecuentemente en suelos debido a su carácter hidrofóbico y por lo tanto potencialmente persistente en el mismo, además de por sus propiedades tóxicas. El herbicida seleccionado es Diurón, perteneciente a la familia química de las fenilureas.

Los objetivos específicos que se persiguen en la presente Tesis doctoral son los siguientes:

1. Estudiar el efecto de distintas CDs naturales y sintéticas en la solubilidad en agua del herbicida Diurón, determinando las CDs más apropiadas así como las condiciones más idóneas para conseguir la máxima solubilidad.
2. Estimar la potencial capacidad de Diurón para ser retenido en suelos, a través de la realización de isotermas de adsorción-desorción sobre suelos con diferentes propiedades físico-químicas, así como en diferentes componentes coloidales. También se realizarán estudios de movilidad de Diurón en columnas de suelos de distintas características en presencia y ausencia de ciclodextrinas, mediante la obtención de curvas de lixiviación, así como mediante extracción del plaguicida del suelo y, si la presencia de la CD podría provocar un incremento en la tasa de degradación del herbicida consiguiendo una mejora en la biodisponibilidad del mismo.
3. Monitorizar en laboratorio los procesos de biodegradación y mineralización de Diurón en solución empleando tanto cepas bacterianas degradadoras específicas del herbicida, obtenidas de colecciones ya descritas en la literatura, como consorcios y cepas bacterianas aislados de suelos contaminados, observando cuales son las más activas para la degradación del herbicida.
4. Detectar genes que codifican la síntesis de enzimas degradadoras específicas, tanto en las cepas bacterianas como en los suelos estudiados, implicadas en la ruta metabólica del herbicida Diurón aplicando técnicas de biología molecular.

5. Monitorizar diferentes tratamientos de biorrecuperación basados en la atenuación natural asistida a través de bioestimulación (solución de nutrientes o enmiendas orgánicas), bioaumentación (adición de bacterias o consorcios bacterianos) y/o el incremento de su biodisponibilidad mediante el uso de soluciones de CDs, con el fin de recuperar suelos contaminados por este herbicida.
6. Evaluar la biodisponibilidad de residuos envejecidos del herbicida Diurón correlacionando técnicas químicas (técnicas de extracción no exhaustivas) y biológicas (mineralizaciones).
7. Estimar el riesgo tóxico de residuos envejecidos del herbicida Diurón correlacionando técnicas químicas (técnicas de extracción no exhaustivas) y biológicas (estudios de biotoxicidad en plantas).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Herbicida y metabolito

Se ha utilizado Diurón en polvo (pureza > 98%), suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España). El Diurón marcado radiactivamente en el anillo aromático se adquirió del Instituto de Isótopos Co., Ltd., (Budapest, Hungría). Actividad específica, 36 mCi mmol⁻¹; pureza química, 99,9%; pureza radioquímica, 100%.

El metabolito del herbicida Diurón estudiado en esta Tesis fue 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) en polvo (pureza > 95%), suministrado por Sigma Aldrich (Madrid, España).

3.1.2. Componentes coloidales

Diferentes componentes coloidales del suelo fueron empleados en el presente estudio:

- *Mineral de la arcilla montmorillonita (M)*, suministrado por Source Clay Minerals Repository (Missouri, USA). Su capacidad de cambio catiónico (CCC) es de 76,4 meq/100 g, siendo sus principales cationes de cambio Na⁺ y Ca²⁺.
- *Ácido húmico sintético (AH)*, suministrado por Fluka.
- *Goetita acicular sintética (GT)*, oxihidróxido con una superficie específica de 43 m² g⁻¹ y un punto cero de carga (pzc) de 8,2 (Pérez-Maqueda, 1999).

3.1.3. Suelos

Para la realización de los estudios de esta memoria se usaron 10 suelos con diferentes características tanto físicas como químicas. Estos suelos proceden de diferentes zonas del sur de Andalucía, España. Todos fueron tomados del horizonte superficial (0-20 cm), secados al aire y pasados por un tamiz de luz de malla de 2 mm antes de ser usados en los experimentos.

Los suelos **CR**, **CRF** y **VG** fueron tomados de una zona de olivar situada en la finca experimental La HAMPa perteneciente al Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC). La característica más relevante es la textura gruesa (arena) que presentan.

El suelo llamado **LM** procede de “Los Marines” (Huelva), concretamente en la carretera de Aracena a Puerto Moral. La vegetación natural es *Quercus ilex* y gramíneas, siendo su uso como dehesa de castañar. Este suelo es de color rojizo, limoso, y con una estructura grumosa media y muy porosa.

Los suelos **PLD** y **PLS** están localizados en la finca Monroy de Dos Hermanas (Sevilla). Han sido tratados con herbicidas organoclorados durante mucho tiempo. La vegetación que presentan es trigo, cereales y viña.

El séptimo suelo denominado **TM** es un suelo agrícola arcilloso localizado en la finca Tomejil (Carmona) perteneciente al Centro de Investigación y Formación Agraria “Las Torres-Tomejil” (Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía). Este tipo de suelo es el llamado tierra negra de la “Vega de Carmona”.

El suelo **P44** pertenece a una zona dedicada a dehesa en la finca “Dos Hermanas”, situada en Santa Bárbara de Casas (Huelva). Está desarrollado sobre granito. La vegetación es natural.

Los dos últimos suelos han sido denominados **AL** y **FH**. **AL** se encuentra situado a la salida del pueblo de Los Marines dirección Fuenteheridos. El suelo **FH** se encuentra situado en la carretera de Fuenteheridos dirección Alajar. El terreno donde está situado **AL** es sobre un material original de calizas cámbricas, encontrándose muy drenado y ligeramente húmedo. El uso agrícola de ambos suelos es principalmente el cultivo del olivar.

En la Tabla 2.1 se representan las características físico-químicas generales de los suelos estudiados. Estos presentan características muy diversas en sus propiedades físico-químicas. Uno de los factores más importantes que se ha tenido en cuenta a la hora de realizar la elección de los suelos ha sido la diversidad de su fracción coloidal, ya que ésta es la que tiene mayor reactividad en la adsorción de plaguicidas y de distintos componentes orgánicos.

Tabla 2.1. *Propiedades físico-químicas de los suelos empleados.*

Suelos	pH	CO ₃ ⁻² (%)	MO (%)	Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Clasificación Textural
FH	6,23	1,60	3,37	24,2	59,4	16,4	Franco limoso
PLS	8,30	21,4	2,91	64,0	16,5	18,3	Franco arenoso
AL	6,97	2,00	2,13	31,6	53,6	14,8	Franco limoso
TM	8,00	24,1	1,76	2,70	31,5	65,9	Arcilloso
VG	8,73	27,5	1,75	59,4	15,9	24,6	Franco arenoso
PLD	8,24	9,70	1,67	47,0	17,1	34,5	Franco arcilloso
P44	5,50	0,00	1,56	49,8	34,5	15,7	Franco
LM	6,00	0,00	1,41	16,7	58,6	24,7	Franco limoso
CRF	8,68	11,6	0,66	73,9	16,1	10,0	Franco arenoso
CR	8,58	11,0	0,20	95,3	4,10	0,60	Arenoso

El pH de los suelos va desde 5,50 a 8,73, relacionado generalmente con el contenido en carbonatos, que están en el rango entre 0,00% y 27,5%.

Debido a la importancia de la cantidad de materia orgánica presente en los suelos a la hora de predecir la posible adsorción de compuestos hidrofóbicos, como es el herbicida estudiado, se han seleccionado suelos con diferentes contenido en materia orgánica (MO) que varía en un amplio rango: desde 0,20% a 3,37% (0,12% - 1,96% de carbono orgánico, CO).

Otro de los factores determinantes para la adsorción de herbicidas en suelos es el contenido en fracción arcilla de los mismos, por lo que se han empleado suelos con contenidos muy variable, desde 65,9% en el suelo TM hasta 0,60% en el suelo CR.

3.1.4. Ciclodextrinas

Se han empleado dos ciclodextrinas (CDs) de origen natural, con una pureza > 98%: β -ciclodextrina (BCD), por ser la de utilización más frecuente y la más económica, y γ -ciclodextrina (GCD). Además se han usado otras tres CDs de origen sintético: 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPBCD), 2-hidroxipropil- γ -ciclodextrina (HPGCD) y una β -ciclodextrina metilada aleatoriamente (RAMEB), todas con una pureza > 97%. Las CDs empleadas fueron suministradas por Cyclolab (Budapest, Hungría). En la Tabla 2.2, se muestran las solubilidades en agua (g L^{-1}) y los pesos moleculares de las distintas CDs empleadas, tanto naturales como sintéticas.

Tabla 2.2. Solubilidad acuosa (g L^{-1}) y pesos moleculares de las distintas CDs empleadas.

CDs	GCD	BCD	HPGCD	HPBCD	RAMEB
Solubilidad en agua (g L^{-1})	232	18	> 500	> 330	> 330
Pesos moleculares	1297	1135	1576	1303,3	1303,9

3.1.5. Enmiendas orgánicas

Una de las enmiendas utilizadas, la denominada RSU, ha sido obtenida de un compost de residuos sólidos urbanos obtenido en un reactor semiindustrial, en la que se utilizaron residuos del comedor universitario del campus de El Carmen de la Universidad de Huelva (López y col., 2011). La otra enmienda, denominada LDA, es un compost preparado con lodos de depuradora (LDA) de la estación depuradora de aguas residuales de EMASESA en Sevilla, mezclado con restos de poda (para darle la consistencia adecuada para poder ser compostado). Sus principales

características se muestran en la Tabla 2.3. Ambas enmiendas tienen un contenido apreciable de nutrientes que favorecerán la actividad microbiana. Aunque el lodo de depuradora tiene unos contenidos de elementos potencialmente tóxicos más elevados, no son suficientes para que su uso en dosis moderadas pueda tener efectos negativos en el suelo.

Tabla 2.3. *Parámetros de las dos enmiendas usadas en este estudio.*

Parámetros	Compost LDA	Compost RSU
Materia orgánica (%)	22,3	79,0
pH	6,40	6,74
UFC (UFC g⁻¹)	68 x 10 ⁵	23 x 10 ⁵
Conductividad Eléctrica (dS m⁻¹)	7,95	8,70
Nitrógeno Kjeldahl (%)	1,7	1,8
Fósforo (%P₂O₅)	3,94	0,58
Potasio (%K₂O)	0,82	1,25
Calcio (% CaO)	9,55	5,36
Magnesio (% MgO)	1,18	0,43
Sodio (%)	0,03	0,62
Hierro (%)	1,88	0,47
Manganeso (mg kg⁻¹)	252	86
Cobre (mg kg⁻¹)	325	57
Zinc (mg kg⁻¹)	563	49
Plomo (mg kg⁻¹)	184	60
Níquel (mg kg⁻¹)	59	16
Cadmio (mg kg⁻¹)	2	< 1
Materia orgánica disuelta (MOD) (g kg⁻¹)	0,1	0,7

Se han seleccionado estos 2 tipos de enmiendas (RSU y LDA) porque son económicas y fácilmente accesibles en cualquier núcleo urbano, ya que la legislación actual en temas de tratamiento de aguas y residuos favorece la generación de estos. En el caso concreto de Andalucía, los Planes Directores de Residuos de las últimas décadas han multiplicado las instalaciones dedicadas al compostaje de residuos orgánicos como los usados en el presente proyecto.

Según los criterios aplicables a los productos fertilizantes elaborados con residuos y otros componentes orgánicos (BOE Real Decreto 824/2005, anexo V) el compost RSU pertenece a la

clase B y el compost LDA a la clase C, porque el contenido en elementos potencialmente tóxicos de cada compost no supera ninguno de los límites máximos establecidos en cada clase. El compost RSU no puede incluirse en la clase A de esta clasificación sólo porque supera los valores de plomo (Plomo en clase A: 45 mg kg^{-1}). Los productos de la clase C, según estos criterios, no podrán aplicarse sobre suelos agrícolas en dosis superiores a cinco toneladas de materia seca por ha y año. En los ensayos realizados no se superan estas concentraciones. Por lo tanto, el empleo de estos dos compost no produce un peor impacto medio ambiental, sino que son utilizados como fertilizantes agrícolas para descontaminar y degradar el herbicida Diurón.

3.1.6. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo fueron las siguientes:

- *Advenella* sp. SLODRJ-01, previamente aislada e identificada en un suelo contaminado por derivados del petróleo, hidrocarburos clorados y ftalatos (Sopeña y col. 2014). La morfología de esta bacteria fue descrita por Ghosh y col. (2005, 2013) y Coenye y col. (2005). No contienen flagelos, aparece sola, en parejas, en cadenas, en cadenas ramificadas o en grupos. Es Gram negativa, ovaladas en forma de coco. Presentan revestimientos capsulares y aproximadamente miden entre $1,0 - 1,8 \mu\text{m}$ de largo por $0,6 - 1,5 \mu\text{m}$ de ancho.
- *Arthrobacter* sp. N23, capaz de crecer con Diurón como única fuente de carbono, fue caracterizada por Widehem y col. (2002) y adquirida de la Colección del Instituto Pasteur (París, Francia). Su código en esta colección es CIP 105365. Esta bacteria es Gram positiva, esférica y aproximadamente $0,7 \mu\text{m}$ de diámetro. Forman grupos o cadenas en solución, son móviles y no presentan esporas (Borodina y col. 2002).

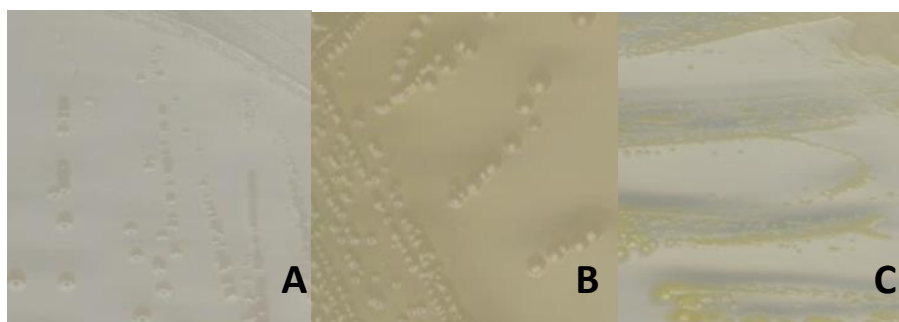


Figura 2.1. Cepas bacterianas cultivadas. **A:** *Advenella* sp. SLODRJ-01; **B:** *Arthrobacter* sp. N23; **C:** *Variovorax* sp. SRS16.

- *Variovorax* sp. SRS16, proporcionada amablemente por el Doctor Sebastian Sorensen, del Instituto “Geological Survey of Denmark and Greenland” (GEUS, Copenhagen, Dinamarca). Esta bacteria es capaz de mineralizar Diurón y otros herbicidas del grupo de las fenilureas, utilizándolos como única fuente de carbono (Sorensen y col. 2008). Según Kim y col., (2006) esta

bacteria es Gram negativa, bacilo móvil y no presenta esporas, aproximadamente miden entre 0,5 - 0,7 µm de largo por 1,0 - 1,5 µm de ancho.

3.1.7. Planta

Se ha utilizado cebada (*Hordeum vulgare*), una planta monocotiledónea anual perteneciente a la familia de las poáceas (gramíneas). Es un cereal de gran importancia tanto para el animal como para las personas y actualmente el quinto cereal más cultivado en el mundo (53 millones de hectáreas). La cebada es un cereal de los conocidos como cereal de invierno y generalmente su distribución es similar a la del trigo, pero además se cultiva en zonas donde este no puede cultivarse por el frío.

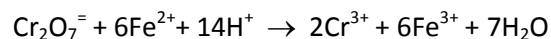
3.2. MÉTODOS

3.2.1. Determinaciones analíticas para la caracterización de los suelos

Antes de proceder a los diferentes ensayos, las 10 muestras de suelos naturales se secaron al aire a temperatura ambiente durante 24 horas, se separaron las piedras y se rompieron los agregados con un rodillo. Las muestras así preparadas se pasaron por un tamiz con luz de malla de 2 mm. Para los diferentes ensayos se tomaron alícuotas representativas, siguiendo el método del “cuarteado” y para aquellos ensayos con necesidad de un mayor grado de subdivisión se molieron en mortero de ágata.

- **Determinación del carbono orgánico total y materia orgánica**

El método seguido ha sido el basado en la técnica descrita por Walkley y Black (1934), que consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato potásico ($\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) en presencia de ácido sulfúrico y posterior valoración del dicromato no reducido con sal de Mohr (valoración por retroceso), según la reacción:



Para ello se tomaron 2 g de muestra de suelo, finamente pulverizada y secada en una estufa a 60 °C durante toda la noche. La muestra una vez pesada se introdujo en un matraz erlenmeyer de 500 mL y se le agregaron 10 mL $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1N, sometiéndose posteriormente a agitación suave hasta que todo el suelo quedara empapado de esta solución. A continuación se agregaron 20 mL de ácido sulfúrico concentrado con agitación suave durante treinta segundos, al cabo de los cuales se dejó en reposo durante treinta minutos. Después se añadieron 200 mL de agua desmineralizada y se enfrió hasta temperatura ambiente. Se añadieron 10 mL de ácido fosfórico concentrado seguido de 1 mL de solución de difenilamina (2,5 g de producto disuelto en 20 mL

de agua y 100 mL de ácido sulfúrico concentrado). Nuevamente se enfrió hasta temperatura ambiente e inmediatamente se procedió a valorar el exceso de dicromato no reducido mediante solución de sal de Mohr 0,5 N.

Suponiendo que la materia orgánica contiene el 58% de C, se ha utilizado 1724 como factor de conversión de carbono orgánico total a materia orgánica, de acuerdo con Jackson (1982).

- **Determinación de materia orgánica disuelta**

La determinación de la materia orgánica disuelta (MOD) se realizó según Pérez de Mora y col. (2006). Se añaden a 3 g de suelo 30 mL de agua destilada y se dejan reposar 24 horas. Al día siguiente, se agitan en un agitador orbital durante 2 horas. Pasado este tiempo se centrifugan a 7000 rpm durante 10 minutos, se filtran y se añaden 3 gotas de HNO_3 . Finalmente, se analiza el sobrenadante en el analizador de carbono orgánico total (TOC).

- **Determinación del pH**

Se siguió el método propuesto por Guitán y Carballas (1976), mediante la medida en pasta saturada de muestra en agua. Para ello un vaso de 50 mL de capacidad, se llenó de muestra hasta las 3/4 partes y se añadieron cantidades sucesivas de agua desmineralizada hasta obtener una pasta espesa. Sin agitar y dejando que el suelo se humedezca por capilaridad se siguió agregando agua hasta que un orificio hecho en el centro con una varilla se cierra lentamente. Se dejó reposar durante treinta minutos, transcurridos los cuales se hizo la medida potenciométrica con electrodo de vidrio.

- **Determinación de la granulometría**

Se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Gee y Bauder (1986), usando hexametáfosfato sódico como agente dispersante. Las fracciones de arena gruesa (2-0,2 mm) y fina (0,2-0,02 mm) se determinaron por tamizado en húmedo y posterior pesada. Las fracciones limo (0,02 mm-2 μm) y arcilla (< 2 μm) se determinaron a partir de las lecturas obtenidas con un hidrómetro Bouyoucos.

- **Determinación de carbonatos**

El suelo se trata con HCl y el volumen de CO_2 desprendido es medido a través de un calcímetro Bernard. Los resultados se expresan en porcentaje de CaCO_3 equivalente en el suelo.

- **Determinación de los óxidos amorfos**

Se ha extraído hierro, manganeso y aluminio amorfos presentes en los suelos siguiendo el método propuesto por McKeague y col. (1971). Se han empleado 0,75 g de muestra dispersada en 30 mL de solución tampón oxalato amónico (0,2 M) - oxálico a pH 3, agitándose durante

4 horas en oscuridad. Se determinaron por ICP-OES (Plasma acoplado por inducción con detección por espectroscopía de emisión óptica).

3.2.2. Análisis del herbicida Diurón y su metabolito 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA)

La concentración del herbicida Diurón y de su principal metabolito, 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) en solución se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). En ambos casos el volumen de inyección fue de 100 µL. Para la detección se utilizó un detector ultravioleta visible. Las condiciones empleadas en dichos análisis se presentan en la Tabla 2.4. Cuando se observa sólo Diurón se emplean las condiciones de la Tabla 2.4 y, cuando se analiza el herbicida junto a su metabolito se trabaja con las condiciones, también mostradas en la misma tabla, según Sorensen y col. (2013). En el análisis conjunto de Diurón y 3,4-DCA bajo las condiciones expuestas se ha comprobado que no existe ningún tipo de interferencia o solapamiento entre las señales del herbicida y su principal metabolito (tiempo de retención 2,5 y 12 minutos para Diurón y 3,4-dicloroanilina, respectivamente).

Para la realización de la curva de calibrado a utilizar en la determinación de Diurón por HPLC se inyectaron seis puntos en unos rangos de concentraciones diferentes de Diurón según el experimento. Las áreas de los picos integrados fueron usadas para cuantificar el Diurón.

Los cromatogramas se obtuvieron en un equipo de HPLC compacto (LC-2010A HT Shimadzu) con un detector ultravioleta - visible, empleando una columna Kromasil C18 de fase reversa (15 x 0,40 cm) suministrada por Teknokroma (España), con un volumen de inyección de 100 µL y a una temperatura de horno de 30 °C. Para la adquisición y manejo de los datos se empleó el programa informático Shimadzu LC Solution Chromatography Data System.

Tabla 2.4. Condiciones empleadas en el análisis del herbicida Diurón y su principal metabolito (3,4-DCA).

Compuestos	Fase Móvil				Tiempo de retención (min)	Longitud de onda (λ) (nm)
	Acetonitrilo (%)	Metanol (%)	Agua MiliQ (%)	Flujo (mL/min)		
Diurón	60	-	40	1,00	2,5	230
Diurón + 3,4-DCA*	-	30	70 (0,01% HPO ₃)	0,65	12	220

*(Sorensen y col. 2013)

3.2.3. Ensayos de solubilidad de Diurón en presencia de ciclodextrinas

Los estudios de solubilidad se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito por Higuchi y Connors (1965). El Diurón se añadió en cantidades que excedían de su solubilidad teórica a 25 °C, añadiendo 5 mg a 5 mL de soluciones de CDs a distintas concentraciones crecientes (desde 0 hasta 0,1M para RAMEB, HPGCD y HPBCD; y hasta 0,01M para BCD y GCD). El ensayo se hizo en viales de 10 mL, los cuales se pusieron en agitación a 25 °C durante una semana (tiempo comprobado para que se alcanzara el equilibrio de complejación). Las soluciones sobrenadantes así obtenidas fueron filtradas usando filtros de jeringa de PTFE (0,45 µm, 13 mmØ) y, posteriormente fueron analizadas mediante HPLC tal como se describe en el apartado anterior 3.2.2.

Los resultados obtenidos fueron utilizados para realizar los diagramas de solubilidad de fases, representando la concentración de Diurón disuelto frente a las concentraciones crecientes de las CDs empleadas. La constante de estabilidad aparente de formación de los complejos (K_c), se calculó a partir de la pendiente de la curva del tipo A_L o bien de la pendiente de la porción inicial de la curva tipo B_s , según los modelos y la ecuación propuesta por Higuchi y Connors (1965):

$$K_c = \text{Pendiente} / S_0 (1 - \text{Pendiente}) \quad (1)$$

donde S_0 es la concentración en equilibrio del herbicida en solución acuosa en ausencia de CDs, y la *pendiente* es la correspondiente a la curva de solubilidad de fases.

Otro parámetro que se puede obtener a partir del diagrama de solubilidad es la eficacia solubilizante (S_e), que se define como el aumento de solubilidad relativa del compuesto orgánico observado a una determinada concentración de CD con respecto a su solubilidad acuosa a 25 °C, a partir de la siguiente ecuación:

$$S_e = S_{CD} / S_0 \quad (2)$$

S_{CD} : Solubilidad del herbicida a una determinada concentración de CD.

S_0 : Solubilidad del herbicida en ausencia de CD.

La formación de los complejos de inclusión fue modelizada empleando un servicio web "Cyclodextrin Knowledge" (<http://www.cyclodextrin.net>) capaz de proporcionar información compleja de modelizaciones moleculares a través de simulaciones por ordenador en 3D permitiendo una rápida revisión de los datos publicados, así como una búsqueda de estructuras en la literatura disponible sobre complejos ligando-CD (Hazai y col. 2010). Para el presente trabajo se determinó la interacción entre la molécula de Diurón y las CDs empleadas (GCD, BCD, HPGCD, HPBCD y RAMEB) obteniendo el estado energético más estable y de menor energía.

3.2.4. Estudios de adsorción-desorción de Diurón en componentes coloidales y en suelos

Para medir la capacidad de adsorción del herbicida Diurón sobre diferentes componentes coloidales se tomaron 50 mg de cada uno de ellos (HA, SW y GT) y se pusieron en contacto con 10 mL de una disolución que contenía $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01M (empleado para mantener la fuerza iónica constante) a 3 concentraciones distintas del herbicida (5, 10 y 15 mg L^{-1}). Se agitaron en tubos de centrífuga de 30 mL durante 24 horas a 100 rpm y 20 ± 1 °C de temperatura (tiempo suficiente para que se alcanzara el equilibrio de adsorción-desorción). Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas (durante 10 minutos a 11000 rpm) y del sobrenadante se retiraron 5 mL, para medir la cantidad de Diurón no adsorbido. Las isothermas de desorción se llevaron a cabo reemplazando los 5 mL del sobrenadante retirados por 5 mL de solución 0,01 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Las suspensiones se dejaron equilibrar durante otras 24 horas más en las mismas condiciones anteriores. Este proceso se repitió hasta un total de tres veces.

Las isothermas de adsorción-desorción en suelos se llevaron a cabo en suelos de diferentes propiedades: CR, VG, LM, TM, P44, AL y FH, descritos en el apartado 3.1.3 de Materiales. Se pesaron 10 g de cada uno de los suelos en tubos de centrífuga de 30 mL de capacidad y se pusieron en contacto con 10 mL de una solución de Diurón a 5 concentraciones diferentes (2, 5, 10, 15 y 20 mg L^{-1}) en un medio 0,01M en $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ para mantener la fuerza iónica constante. Los tubos se mantuvieron en agitación durante 72 horas a 120 rpm y 20 ± 1 °C de temperatura. Fue necesario agitar durante 72 horas para que los 7 suelos alcanzaran el equilibrio. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Posteriormente las suspensiones fueron centrifugadas (durante 10 minutos a 11000 rpm) y se midió por HPLC con detector ultravioleta la cantidad de Diurón en el sobrenadante.

Las isothermas de adsorción se obtuvieron representando la cantidad adsorbida, expresada en μmol de Diurón adsorbido por kg de suelo ($\mu\text{mol kg}^{-1}$) frente a las correspondientes concentraciones del herbicida en equilibrio ($\mu\text{mol L}^{-1}$). Las isothermas de adsorción han sido ajustadas a la forma logarítmica de la ecuación de Freundlich:

$$\log C_s = \log k_f + n \log C_e \quad (3)$$

donde:

C_s ($\mu\text{mol kg}^{-1}$): cantidad de herbicida adsorbido por kilogramo de suelo.

C_e ($\mu\text{mol L}^{-1}$): concentración de herbicida en la solución de equilibrio.

k_f : es una constante relacionada con la capacidad de adsorción del suelo y representa la cantidad de herbicida adsorbido cuando la concentración de equilibrio es la unidad.

n: es un parámetro que indica la intensidad de la adsorción y está relacionado con la curvatura de la isoterma.

Aplicando dicha ecuación se calcularon los parámetros de la isoterma de Freundlich, k_f y n .

El papel que juegan los enlaces hidrofóbicos con la materia orgánica en la adsorción de herbicidas no polares en suelos puede ser comparado utilizando el coeficiente de distribución de un determinado herbicida en un suelo determinado para una concentración de equilibrio fija (k_d), pero referido al porcentaje de carbono orgánico del suelo (k_{oc}). Los coeficientes de distribución (k_d) han sido calculados a una concentración de equilibrio de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, los cuales han sido usados a su vez para calcular los coeficientes normalizados teniendo en cuenta el porcentaje de carbono orgánico de los suelos, (k_{oc}).

$$K_{oc} = (K_d / \%CO) \times 100 \quad (4)$$

Las isotermas de desorción se llevaron a cabo reemplazando la mitad del sobrenadante de los tubos de centrífuga, una vez que el equilibrio de adsorción se había alcanzado, por 5 mL de una solución 0,01 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y/o por 5 mL de una solución de HPBCD equivalente a 10 veces la concentración molar del herbicida a la concentración de 10 mg L^{-1} inicialmente añadido (1061 mg L^{-1} , $8,1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$). Las suspensiones se dejaron equilibrar durante otras 24 horas más en las mismas condiciones anteriores y posteriormente se volvió a retirar la mitad del sobrenadante en el que se determinó por HPLC la concentración de Diurón. Este proceso se repitió hasta un total de tres veces.

Las isotermas de adsorción-desorción de los suelos fueron modelizadas mediante el modelo matemático SOLVER de Microsoft Office Excel 2007, a partir del cual se obtuvieron las constantes k_f y " n ". Para las correlaciones de los estudios de adsorción y desorción se empleó el paquete estadístico IBM SPSS V. 21.

3.2.5. Estudios de movilidad y biodegradación de Diurón en columnas de suelo

Se emplearon columnas de metacrilato de 20 cm de altura y 3 cm de diámetro interno. En la Figura 2.2 se muestra de manera esquemática el diseño de estas columnas de suelo. La parte final de la columna fue cubierta por un tejido de nylon sobre el que se colocó una fina capa de lana de vidrio (0,5 g) para contener firmemente al suelo en el interior de la columna e impedir el posible arrastre de partículas de suelo a los lixiviados. También se colocó una fina capa de lana de vidrio en la parte superior de la columna de suelo para impedir la formación de canales preferentes. Cada columna fue empaquetada manualmente hasta obtener 16 cm de altura. En este estudio se emplearon sólo los suelos FH y CR (125 g de suelo FH y 167 g de suelo CR).

En estudios preliminares, una columna de cada suelo de 16 cm de altura fue saturada por capilaridad con agua destilada para obtener un contenido de humedad del 100% de la capacidad de campo. El valor del volumen de poro se calculó por la diferencia de peso entre la columna saturada y su peso seco. El volumen de poro en los suelos seleccionados para llevar a cabo estos experimentos correspondió a 35 mL para FH y 47 mL para CR.

Las columnas de suelo fueron acondicionadas adicionando 5 volúmenes de poro de una solución de 0,01 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, para así equilibrarlas con el electrolito de fondo, y posteriormente se adicionaron 2 mL de una solución madre 312,5 mg L⁻¹ de Diurón en acetona. La cantidad añadida a cada columna equivale a 5 kg ha⁻¹ de Diurón. Se deja evaporar la acetona durante 24 horas antes de comenzar los experimentos de lixiviación.

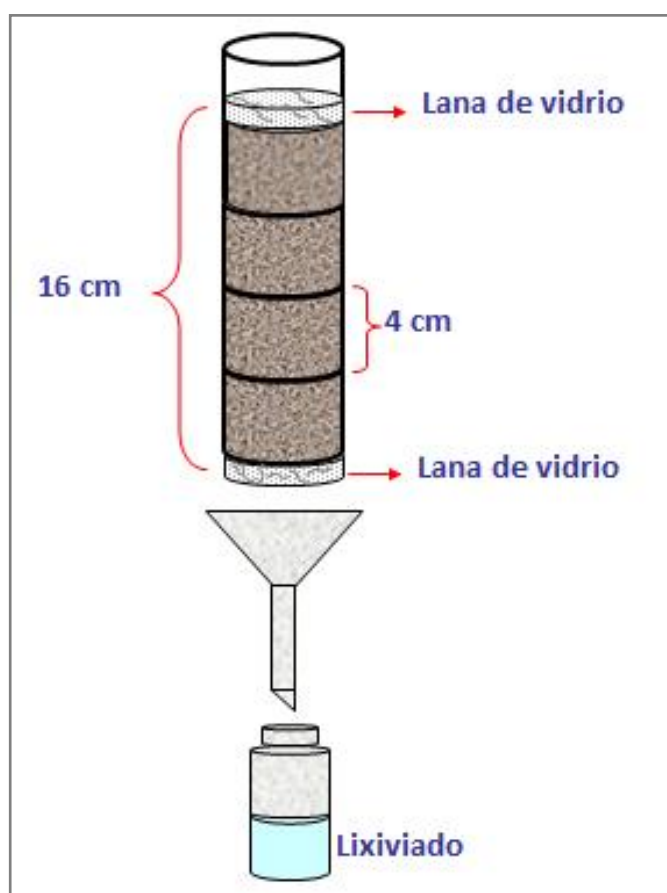


Figura 2.2. Columna de suelo utilizada en los estudios de movilidad de Diurón.

Se realizan 4 replicados de columnas por cada suelo, a dos de los cuales, después de la aplicación del herbicida, se les añadió HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida en sólido. Las curvas de elución se obtuvieron por la aplicación de 10 mL de agua hasta que el herbicida no fue detectado en los lixiviados recogidos. La concentración de herbicida en los lixiviados fue determinada por HPLC. Se hicieron dos replicados de cada suelo con y sin HPBCD.

Una vez finalizados los estudios de elución, se procedió a dividir las columnas de suelo en 4 segmentos de 4 cm de altura dejando el suelo secar. Los residuos de herbicida que permanecieron adsorbidos sobre el suelo de cada fragmento tras los experimentos de lixiviación fueron extraídos de la siguiente manera: se tomaron 2 g de suelo y se añadieron 5 mL de metanol. Fueron agitados durante 24 horas a 20 °C en un agitador de volteo y, centrifugados a 11000 rpm durante 10 minutos y, finalmente filtrados. La concentración de cada herbicida en los filtrados fue determinada mediante HPLC tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.2.

En el suelo FH se realizó también en los dos primeros segmentos un estudio de biodegradación a diferentes tiempos (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 65 días). Se usaron 2 g de suelo y se añadieron 0,2 mL de una solución de nutrientes (SNs) cuyo objetivo fue estimular a los microorganismos favoreciendo el paso a la solución de los degradadores específicos del herbicida, potencialmente capaces de emplearlo como única fuente de carbono (Tabla 2.5).

Tabla 2.5. Solución de nutrientes (SNs).

Nutrientes	$\mu\text{g mL}^{-1}$
Ca SO ₄ . 2 H ₂ O	10,0
Zn SO ₄ . 7 H ₂ O	12,5
Al ₂ (SO ₄) ₃ . 18 H ₂ O	12,5
Ni Cl ₂ . 6 H ₂ O	12,5
Co Cl ₂ . 6 H ₂ O	12,5
Sn Cl ₂ . 2 H ₂ O	25,0
Fe SO ₄ . 7 H ₂ O	37,5
Li Cl	2,50
K Br	3,75
K Cl	3,75
Mn Cl ₂ . 4 H ₂ O	75,0

Las muestras a diferentes tiempos de envejecimiento fueron congeladas y en el último punto de envejecimiento se realizaron extracciones con 5 mL de metanol a las mismas condiciones que se hicieron las extracciones anteriores. La concentración del herbicida en los filtrados fue determinada mediante HPLC tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.2. Estas curvas de biodegradación fueron ajustadas y modelizadas usando la guía FOCUS (2006). Las dos curvas se ajustaron al modelo de cinética de primer orden simple (SFO). Este modelo se explica en el apartado 3.2.7.

3.2.6. Estudios de biodegradación de Diurón en solución

Se realizaron experimentos de biodegradación de Diurón con las tres cepas bacterianas mencionadas en el apartado 3.1.6 de Materiales, las cuales fueron identificadas a nivel de especie según la metodología que se describirá en el apartado 3.2.8.2 de este trabajo. A lo largo de toda la Tesis Doctoral *Advenella kashmirensis*, *Arthrobacter sulfonivorans* y *Variovorax soli*, se nombrarán como *A. kashmirensis*, *A. sulfonivorans* y *V. soli*, respectivamente.

La preparación de los inóculos de estas cepas bacterianas se llevó a cabo tal y como se explica a continuación.

Preparación de los inóculos bacterianos

Las tres cepas a ensayar se sembraron en placas Petri a partir de crioviales (Microbank PL170/M, PROLAB Diagnostics) especialmente diseñados para ese cometido. Estos contienen pequeñas esferas porosas que sirven de soporte para las bacterias y que a su vez se encuentran sumergidas en un líquido crioprotector, cuya composición no es suministrada por el fabricante. Los crioviales se conservaron a -80 °C en congelador, (Revco Elite Plus, Clarkson Laboratory & Supply Inc. USA).

Cada una de las cepas bacterianas se sembraron en el medio de cultivo más adecuado para su crecimiento: *A. sulfonivorans* en LB y *A. kashmirensis* y *V. soli* en R2A. En la Tabla 2.6 se recoge la composición de estos los medios de cultivo utilizados en la presente Tesis Doctoral.

A las 48 horas, a partir de cada placa Petri, las tres cepas se sembraron en cuadrantes por duplicado en nuevas placas Petri, dejándolas incubar durante 72 horas para conseguir obtener biomasa suficiente para preparar los cultivos en medio MSM (Tabla 2.6) de las tres cepas bacterianas. La densidad óptica de los cultivos se ajustó a la solución de McFarland del número 4 (13×10^8 UFC mL⁻¹). En microbiología, los estándares de turbidez de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber el número de bacterias por mililitro, o más bien en CFU, según una escala que va de 0,5 a 10. Estos estándares son creados al mezclar soluciones de cloruro de bario al 1% con ácido sulfúrico al 1% en volúmenes específicos. Los estándares pueden ser visualmente comparados con suspensiones de bacterias en solución salina estéril. La ventaja de este método es que no es necesario incubar ni usar equipo especial para estimar el número de bacterias.

Durante el periodo de crecimiento de las bacterias se hizo un seguimiento de la densidad óptica de los cultivos a lo largo del tiempo, midiéndola a 600 nm en un espectofotómetro UV-Visible, Hitachi U 1800. Para la preparación de los inóculos para los experimentos de biodegradación, las bacterias se tomaron dentro de la fase estacionaria de crecimiento. Los medios de cultivo fueron suplementados con Diurón (10 mg L⁻¹) y 1 mL de una solución de nutrientes (SNs, Tabla 2.5).

Tabla 2.6. Composición (g L^{-1}) de los medios de cultivo utilizados en este trabajo.

Reactivos	MSM ⁽¹⁾	LB ⁽²⁾	LB agar	R2A ⁽³⁾	R2A agar
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,8				
KH_2PO_4	2,0				
Na_2HPO_4	4,0				
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$	1,6			0,5	0,5
NaCl		10	10		
Triptona		10	10		
Extracto de levadura		5,0	5,0		
Peptona				0,5	0,5
Casaminoácidos				0,5	0,5
Extracto de levadura				0,5	0,5
Glucosa				0,5	0,5
Almidón				0,5	0,5
K_2HPO_4				0,5	0,5
Piruvato sódico				0,5	0,5
Bacto Agar			20		20

(1) MSM: Mineral salts medium. Resultado de la mezcla de las siguientes disoluciones:

Disolución I: 2,0 g de KH_2PO_4 más 4,0 g de Na_2HPO_4 en 500 mL de agua destilada.

Disolución II: 1,6 g de $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ mas 0,8 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 500 mL de agua destilada.

El pH se ajustó con NaOH a 7,5.

(2) LB: Luria –Bertani medium. Medio 381 de la lista de medios para microorganismos (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

(3) R2A: Medio 830 de la lista de medios para microorganismos (Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Este medio también se utilizó diluido 40 veces para estudios en placas Petri con y sin Diurón y HPBCD para observar el crecimiento de las cepas bacterianas.

Para la preparación de los inóculos de las bacterias se siguió el siguiente procedimiento: los cultivos se filtraron a través de placas porosas de 40 μm de tamaño de poro para retirar restos de los medios de cultivo. A continuación se lavaron tres veces con medio de cultivo MSM y se centrifugaron durante 10 min a 7000 rpm. Tras el lavado, los tres pellets obtenidos se resuspendieron, por separado, cada en un volumen conocido de medio de cultivo MSM y finalmente se mezclaron. Las células viables se cuantificaron en cada experimento como unidades formadoras de colonias (UFC) en medio sólido MSM.

La cepa bacteriana *A. kashmirensis* fue aislada en el laboratorio a partir de un suelo contaminado, el cual fue enriquecido con fenantreno, tal como se describe en Sopeña y col. (2013). Se trata de un suelo industrial perteneciente a una industria química clausurada, cuya principal actividad fue

la destilación de compuestos orgánicos, tales como naftaleno y derivados fenólicos. En este terreno hubo almacenamiento masivo de timol (lubricante para laminación) así como vertidos de fuel y otros compuestos orgánicos, por lo que se encuentra afectado por una mezcla de múltiples contaminantes. La bacteria aislada e identificada se conservó a -80 °C en crioviales.

Para los estudios de biodegradación se usaron viales de vidrio estériles de 20 mL en los que se pusieron 15 mL de medio MSM previamente contaminado con Diurón, de forma que la concentración final del herbicida en cada vial de vidrio fuera 10 mg L⁻¹. Los experimentos de biodegradación llevados a cabo se recogen en la Tabla 2.7.

Tabla 2.7. Ensayos de biodegradación de Diurón con las cepas bacterianas en solución y en dinámico.

	TRATAMIENTOS (*)	<i>A. sulfonivorans</i>	<i>V. soli</i>	<i>A. kashmirensis</i>
CEPAS BACTERIANAS	(1)	✓		
	(2)		✓	
	(3)			✓
	(4)	✓	✓	
	(5)	✓		✓
	(6)		✓	✓
	(7)	✓	✓	✓

1(*) Todos los ensayos se realizaron bajo condiciones de esterilidad, con 15 mL de medio MSM y con 0,3 mL de SNs.

Para cada uno de los aislados bacterianos usados se utilizaron 6 viales de vidrio, tres de ellos contenían solamente el medio de cultivo MSM contaminado con Diurón, que fueron los viales “Control”; mientras que los otros tres contenían medio de cultivo MSM contaminado con Diurón al que se añadieron 300 µL del cultivo bacteriano correspondiente (13 x 10⁸ UFC). Los viales cerrados se mantuvieron a 30 °C de temperatura en estufa de laboratorio (Revco Thermo Scientific, USA) durante 20 días. A lo largo de ese periodo se tomaron muestras a distintos tiempos para medir la degradación de Diurón correspondiente, tanto de los viales “Control” como de los viales “Cultivo” de cada uno de los aislados bacterianos, dejando uno de los triplicados de cada uno de ellos sin abrir hasta que no se tomó la muestra correspondiente al último tiempo (20 días), con el objeto de evitar contaminaciones. Justo antes de la toma de muestras los viales se agitaron en vortex durante 10 segundos aproximadamente, con el objeto de homogeneizar el contenido de los mismos.

Para la determinación de la cantidad de Diurón sin degradar en las muestras a lo largo del tiempo se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a detector de ultravioleta visible descrita en el apartado 3.2.2.

3.2.7. Estudios de mineralización de Diurón en el sistema suelo-agua

Para llevar a cabo los ensayos de mineralización se utilizaron respirómetros que constan de un cuerpo principal con matraz de vidrio de 250 mL de capacidad, en cuyo interior se añade el Diurón no marcado y Diurón marcado con ^{14}C en el anillo aromático junto con 50 mL de medio MSM, más el tratamiento a evaluar en cada experimento (10 g de suelo, solución de nutrientes (1 mL SNs), inóculos de las cepas bacterianas y/o consorcios bacterianos, HPBCD y enmiendas). En la parte superior del matraz se coloca un tapón envuelto en cinta de teflón con una trampa de álcali suspendida (1 mL de NaOH 0,5N) (Figura 2.3), la cual será la encargada de recoger la producción de $^{14}\text{CO}_2$ (Reid y col. 2001). La reacción química que se produce en los respirómetros sería la siguiente:

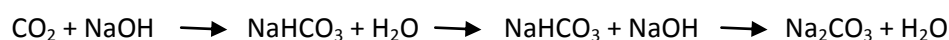


Figura 2.3. Respirómetro empleado para los estudios de mineralización de Diurón y trampa de álcali antes de ser incorporada al matraz erlenmeyer.

Primeramente, se añadieron a los respirómetros aproximadamente 450 Bq de Diurón marcado con ^{14}C en el anillo aromático, así como Diurón no marcado en cantidad necesaria como para que, si se añadieran 10 g de suelo en el experimento, la concentración de Diurón no marcado en el mismo fuera de 50 mg kg^{-1} . El sustrato marcado y el no marcado se añadieron disueltos en acetona, la cual se dejó evaporar antes de añadir el resto de componentes del tratamiento (suelo y/o SNs y/o cepas/consorcios bacterianos y/o enmiendas y/o HPBCD) para que no interfiriera en la mineralización. Finalmente, se homogeniza bien el medio y los sustratos, mediante agitación manual suave.

Los experimentos de mineralización se han realizado tanto en sistemas dinámicos como en estáticos. Dentro de los sistemas en dinámico, se han realizado tanto en solución como en suspensión; estos ensayos se han llevado a cabo en los 10 suelos descritos en el apartado 3.1.3 de Materiales. Las mineralizaciones en dinámico de las cepas bacterianas en solución se hacen paralelas a la biodegradación, en condiciones similares, y están reflejadas en la Tabla 2.7 del apartado anterior. Los demás tratamientos de mineralización se esquematizan a modo de resumen en las siguientes cuatro Tablas 2.8, 2.9, 2.10 y 2.11.

Tabla 2.8. Ensayos de mineralización de Diurón con las cepas bacterianas en solución y en dinámico.

	TRATAMIENTOS (*)	<i>A. sulfonivorans</i>	<i>V. soli</i>	<i>A. kashmirensis</i>
CEPAS BACTERIANAS	(8)	✓		
	(9)		✓	
	(10)			✓
	(11)	✓	✓	
	(12)	✓		✓
	(13)		✓	✓
	(14)	✓	✓	✓

1(*) Todos los ensayos se realizaron bajo condiciones de esterilidad, con 50 mL de medio MSM y con 1 mL de SNs.

Tabla 2.9. Ensayos de mineralización de Diurón con los consorcios bacterianos en solución y en dinámico.

CONSORCIOS BACTERIANOS	C1	C2	C3	C4	C5
TRATAMIENTOS (*)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)

C1, C2, C3, C4 y C5 son los consorcios bacterianos obtenidos de los suelos CRF, PLD, PLS FH y AL, respectivamente.

1(*) Todos los ensayos se realizaron bajo condiciones de esterilidad, con 50 mL de medio MSM y con 1 mL de SNs.

Todos los experimentos se realizaron a una temperatura de 25 °C. Periódicamente, la solución de la trampa de sosa se retiró y se reemplazó por una nueva. La solución de NaOH retirada (1 mL) se mezcló con 4,5 mL de líquido de centelleo (ÚLTIMA GOLD™, PerkinElmer, Inc., USA) y dicha mezcla se mantuvo en oscuridad durante al menos 24 horas para la disipación de la

quimioluminiscencia. La radiactividad se midió en un contador de centelleo líquido modelo Beckman LS5000TD.

Las cepas bacterianas se obtienen de la misma forma que se explicó para los ensayos de biodegradación en el apartado anterior 3.2.6. A continuación se detalla la preparación de los consorcios bacterianos para los ensayos de mineralización.

Obtención de los consorcios bacterianos y preparación de los inóculos

Los consorcios bacterianos se aislaron a partir de 5 suelos que habían sido sometidos a una aplicación continuada de plaguicidas: CRF, PLD, PLS, FH y AL, y los consorcios C1, C2, C3, C4 y C5, respectivamente, se obtuvieron a partir de cultivos de enriquecimiento de cada suelo.

En primer lugar se preparó una suspensión en recipientes estériles de 250 mL con 10 g de cada suelo en 50 mL de medio MSM suplementado con Diurón (40 mg kg^{-1}) y con una solución de nutrientes (SNs).

Cada 15 días se recogían 10 mL de la suspensión y se añadían en 40 mL de medio MSM enriquecido con Diurón (40 mg kg^{-1}) y SNs. Este proceso se repitió 4 veces. A los 60 días, una alícuota de 100 μL de este cultivo se inoculó en placas Petri con R2A–agar (Hussan y col. 2009) y posteriormente se incubaron a 30°C durante 1 semana para finalmente, con asa de siembra estéril, introducir la biomasa a conservar en crioviales al igual que las cepas bacterianas. A partir de estos crioviales se consiguió biomasa suficiente tal y como se ha explicado en el apartado 3.2.6 para las cepas bacterianas. Los inóculos fueron añadidos dentro de la fase estacionaria de crecimiento.

Los experimentos recogidos en la Tabla 2.10 se dividen en suspensión (ensayos del 20 al 30) y en estático (ensayos del 31 al 36). Los suelos en suspensión se dividen a su vez, en dos bloques, del 20 al 22 son en condiciones estériles y del 23 al 30 en condiciones no estériles. Los ensayos donde las condiciones no son estériles, se realizaron para observar la mineralización conjunta de la microflora bacteriana propia de cada suelo con las cepas bacterianas específicas para degradar Diurón.

Los experimentos se realizaron todos por duplicados. En los experimentos con tratamiento 24 se emplearon los suelos CR, VG, LM, PLD, TM, P44 y CRF. Para los tratamientos 25 y 26 se usaron los suelos CR, VG, LM, PLD, TM y P44. Los ensayos 27, 28, 29 y 30 sólo se aplicaron en el suelo CRF empleando las dos enmiendas orgánicas (compost RSU y compost LDA) descritas en el apartado 3.1.5 de Materiales. Los ensayos 31, 32, 33, 34, 35 y 36 fueron realizados sólo en el suelo AL al 40% de humedad en condiciones no estéril. Todos los ensayos, tanto en suspensión como en

dinámico, llevaban 10 g del suelo empleado y 1 mL de SNs. Aparte los diferentes tratamientos que se recogen en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10. Ensayos de mineralización de Diurón en suspensión: **A.1.)** Condiciones de esterilidad. **A.2.)** Condiciones no estériles. Ensayos de mineralización de Diurón en estático, aproximación a un sistema real: **B).**

	TRATAMIENTOS	HPBCD x10	<i>A. sulfonivorans</i>	<i>V. soli</i>	<i>A. Kashmirensis</i>	Compost LDA	Compost RSU	C1
A. 1.)	(20)*		✓	✓	✓			
	(22)	✓	✓	✓	✓			
A. 2.)	(23)							
	(24)	✓						
	(25)		✓	✓	✓			
	(26)	✓	✓	✓	✓			
	(27)					✓		
	(28)						✓	
	(29)	✓				✓		
	(30)	✓					✓	
B)	(31)							
	(32)	✓						
	(33)		✓	✓	✓			
	(34)	✓	✓	✓	✓			
	(35)							✓
	(36)	✓						✓

***Ensayo (21).** Igual tratamiento y condiciones que el experimento 20 pero a diferentes tiempos de envejecimiento (15, 30, 60 y 100 días).

Una vez que se había comprobado que el consorcio bacteriano (*A. sulfonivorans*, *V. soli* y *A. kashmirensis*) es capaz de mineralizar al herbicida Diurón a tiempo 0, se realizó un ensayo (ensayo 21) con todos los suelos seleccionados de esta memoria con el objetivo de estudiar el efecto del envejecimiento del contaminante en la mineralización mediante la inoculación de dicho consorcio bacteriano. Para ello, se doparon los suelos (50 mg kg⁻¹) y se dejó envejecer durante un periodo de tiempo de 15, 30, 60 y 100 días (Tabla 2.10, Tratamiento 21).

Para el cálculo de los parámetros cinéticos de las curvas de mineralización obtenidas en estos ensayos, éstas se ajustaron y fueron modelizadas usando las indicaciones incluidas en la guía FOCUS (2006), grupo de trabajo de expertos constituido en 1993 para ayudar en el cálculo de las cinéticas de disipación necesarias para el proceso europeo de autorización de plaguicidas según

la Directiva 91/414/CEE, empleando el programa matemático SOLVER de Microsoft Office Excel 2007.

Los principales tipos de cinéticas que se describen en el documento de FOCUS son las cinéticas de Primer Orden que engloban a: Cinética Primer Orden Simple (SFO), cinética del Modelo de Hockey-Stick (HS), cinética de Gustafson y Holden, cinética del Modelo Biexponencial y cinética de primer orden bifásica Hockey Stick (HS) modificado, (MHS). Las cinéticas que mejor se ajustaron a las curvas mineralizaciones fueron SFO, HS y MHS. A continuación se hará una breve descripción de cada una de ellas.

La cinética SFO asume que el número de moléculas de herbicida es muy pequeño frente al número de microorganismos y enzimas que lo degradan. Como resultado, el cambio en la concentración del herbicida es directamente proporcional a la concentración que queda de él en el sistema, ya que el resto de componentes están en exceso. Supone que la mineralización está limitada a una cantidad máxima que dependerá de la naturaleza del herbicida y del tipo del suelo. Las desviaciones de la cinética de primer orden se producen porque la disponibilidad del herbicida disminuye con el tiempo, por la variación espacial del proceso de degradación o por la dependencia del proceso de degradación con la disminución de la actividad microbiana. Sólo se obtiene una constante k_1 . Los diferentes parámetros cinéticos se obtendrán a partir de las siguientes ecuaciones:

$$M = M_0 * e^{-kt} \quad (5)$$

$$DT_{50} = \ln 2 / k \quad (6)$$

$$DT_x = (\ln 100 / 100 - x) / k \quad (7)$$

siendo $x = 5$, porcentaje a partir del cual se considera iniciado el proceso de biodegradación.

La cinética HS considera que el suelo consiste en dos compartimentos diferentes, uno de degradación rápida y otro más lenta cada uno afectado por una cinética de primer orden. Inicialmente se aplica todo el producto en el compartimento de degradación rápida donde la concentración del herbicida disminuye mediante una cinética de orden 1 con una K_1 , y en un determinado momento llamado punto de ruptura (t_b), comienza a transferirse al compartimento de degradación lenta, mediante otro proceso de orden 1 con una constante de K_2 . En este modelo bifásico el herbicida se divide directamente entre los dos compartimentos, sin que exista transferencia de uno a otro. Siendo K_1 mayor que la K_2 , ya que la degradación es más rápida al principio. La fase lag que aparece en las mineralizaciones que presentan estas cinéticas fue ajustada a partir del modelo cinético de primer orden bifásica Hockey-Stick (HS) modificado,

(MHS), es decir, se calcula la cinética HS sin la fase lag y luego se realiza una nueva cinética HS, dónde se despreja la fase estacionaria, siendo la fase lag y la fase exponencial los dos compartimentos.

3.2.7.1. Determinación de supervivencia por microscopía de epifluorescencia

Se determinó el porcentaje de bacterias vivas y muertas a lo largo de los experimentos de mineralización en solución en los que se emplearon las 3 cepas bacterianas mediante microscopía de epifluorescencia. Se realizaron experimentos paralelos a los descritos en la Tabla 2.8 pero en ausencia de Diurón marcado. Para ello se empleó el kit L7007 (LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit) que contiene dos componentes (A y B) que al unirlos tiñen a las bacterias dependiendo de su viabilidad: de color verde a las bacterias vivas, y de color rojo a las muertas. Los reactivos son:

Componente A: SYTO 9 dye, 1,67 mM/ Yoduro de propidio, 1,67 mM.

Componente B: SYTO 9 dye, 1,67 mM/ Yoduro de propidio 18,3 mM.

En matraces de 250 mL se añadieron 50 mL de medio MSM, las cepas bacterianas y Diurón 50 mg kg⁻¹. De forma paralela, se realizó un ensayo control, el cual no llevaba incorporado el herbicida Diurón. A diferentes tiempos, (0, 3, 10, 20 y 40 días) se tomaban en un eppendorf 0,5 mL de la solución y se le añadían 2 µL de la mezcla de los componentes A y B (1:1). Para su visualización por microscopía se emplea un objetivo (40x) Zeiss Axioskop, con un software AxioVision (Zeiss).

3.2.8. Técnicas de Biología Molecular

3.2.8.1. Extracción de ADN de las cepas bacterianas

Para la extracción del ADN genómico de las tres cepas bacterianas mencionadas en el apartado 3.1.6 de Materiales, estas se sembraron en placas Petri cada una con su medio: *A. sulfonivorans* creció en medio LB y *A. kashmirensis* y *V. soli* en medio R2A (Tabla 2.5) durante 5 días a 28 °C. Detectado el crecimiento, en condiciones de esterilidad, se transfirió suficiente cantidad de biomasa a un tubo eppendorf con 100 µL de tampón de extracción (Jet quick, PCR TE, Genomed). Se realizó un choque térmico con el fin de extraer el ADN, proporcionando tres ciclos de frío-calor introduciendo las muestras en un congelador a -80 °C durante 10-15 minutos y seguidamente calentándolas a 65 °C con agitación durante 10-15 minutos en un termociclador (Thermomixer 5436, Eppendorf, Germany). Seguidamente se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 5 minutos en centrífuga Eppendorf 5424, trasvasando el sobrenadante a un nuevo eppendorf. El ADN extraído se conservó a -20 °C.

3.2.8.2. Identificación de las cepas bacterianas

Se empleó el ADN genómico extraído, concretamente el gen ribosómico 16S, para la identificación de las cepas bacterianas (*A. sulfonivorans* y *V. soli*). La amplificación del ADN del gen ribosómico 16S (ADNr 16S) se realizó mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando el termociclador Analytikjena FlexCycler Block modelo Block assembly 96G, empleando los cebadores o *primers* (*palabra en inglés, denominado así en todo el trabajo*) en generales de bacterias 616F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG) y 1510R (5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT T) (Tabla 2.11). El protocolo de amplificación comprendió un ciclo de desnaturalización (2 minutos a 94 °C), seguido de 35 ciclos de desnaturalización (20 segundos a 94 °C), hibridación de los *primers* (45 segundos a 55 °C) y elongación (2 minutos a 72 °C) y un ciclo de elongación final (10 minutos a 72 °C). Las reacciones se prepararon en tubos de PCR de 0,2 mL y se componían de 1 µL de solución de ADN molde, 5 µL del tampón de PCR 10x Biotaq (Bioline, EEUU), 1,5 µL de MgCl₂ (solución stock a 50 mM), 1 µL de una mezcla de los cuatro nucleótidos (dNTP) (Invitrogen, EEUU)(concentración stock 10 mM), 0,5 µL de cada uno de los dos *primers* necesarios (concentración stock 50 µM) y 0,25 µL de la enzima ADN polimerasa Biotaq (Bioline, EEUU) (5 unidades/µL) equivalente a 2,5 unidades de enzima. El volumen final de la reacción se completó hasta 50 µL con agua libre de ácidos nucleicos y nucleasas (Sigma-Aldrich, EEUU).

Para confirmar el resultado positivo de las amplificaciones por PCR, los productos de estas reacciones fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa (Seakem®, CAMBREX Bio Science Rockland, New York, EEUU) al 1% (p/v). Para ello, 5 µL de los productos de amplificación por PCR se mezclaron con 1 µL de tampón de carga que lleva incorporado el colorante fluorescente SYBR® Green I (Molecular Probes, EEUU). La electroforesis se realizó en una unidad de electroforesis modelo HU10 (SCIE-PLAS, Southham, Inglaterra) utilizando TAE 0,5x pH 8,2 como tampón de electroforesis. (TAE 50x: Base trishidroximetil-aminometano 242 g L⁻¹; ácido acético glacial 57,1 mL L⁻¹; EDTA 0,5 M, 37,2 g L⁻¹). Se empleó una fuente de alimentación eléctrica EPS 600 (Amersham Biosciences, New York, EEUU). La electroforesis se llevó a cabo durante 25 minutos a 90V.

El gel fue observado en un transiluminador (Vilber Lourmat, Francia) que emite luz UV a una longitud de onda de 312 nm. El gel se fotografió con una cámara digital Kodak Edas® DC290 utilizando el programa "Kodak 1D Image Analysis Software®" (Kodak, EEUU). Los productos positivos de PCR se confirman por la aparición de una banda en el gel. Los productos de PCR que han resultado positivos se purificaron con el kit comercial *mi*-PCR Purification Kit (Metabion *mi*-PP200, Martinsried, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y se secuenciaron a través del Servicio de Secuenciación de SECUGEN (CSIC, Madrid, España).

Para la secuenciación, se prepararon y enviaron a SECUGEN cuatro tubos eppendorf mezclando en cada uno de ellos 10 µL de producto de PCR purificado con 1 µL de diferentes *primer* a una concentración de 5 µM, con objetivo de obtener la secuencia de nucleótidos de fragmentos de ADN que solapasen e intentar conseguir la secuencia ADN del gen ribosómico 16S (ADNr 16S) lo más completa posible. Los cuatro *primers* empleados fueron los *primers* generales de bacterias 616F, 1510F, 519F y 907R (Tabla 2.11).

Los datos de secuencia fueron editados empleando el Software Chromas, versión 2.01 (Technelysium, Tewantin, Australia) y la búsqueda de homología con esas secuencias fueron realizadas mediante la solicitud de BLAST y el EzTaxon database (Altschul y col. 1990) a la base de datos de secuencia GenBank del NCBI. (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/blast/>).

Tabla 2.11. *Primers empleados en las reacciones de amplificación por PCR y secuenciación del gen ribosómico 16S.*

PRIMER ⁽¹⁾	Tm (°C)	GC (%)	Secuencia	Gen	Posición en <i>Escherichia coli</i>
616F (27F;8F) ⁽²⁾	54,3	40	5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3'	16S	8-27
519F ⁽²⁾	53	64,7	5'-GTA TTA CCG CGG CKG CTG-3'	16S	519-536
907 R ⁽²⁾	46	36,8	5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3'	16S	926-907
1510R ⁽³⁾	55,2	47,4	5'-GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	16S	1510-1492

⁽¹⁾ Los *primers* indicados con F se refieren al *primer* en sentido *forward*, aquellos con R se refieren a *primers* antisentido *reverse*.

⁽²⁾ Mao y col. (2012).

⁽³⁾ Echigo y col. (2005).

3.2.8.3. Extracción y concentración de ADN de los suelos

Para la extracción del ADN genómico de los microorganismos presentes en los 10 suelos se utilizó usando el kit de extracción PowerLyzer™ PowerSoil® DNA Isolation Kit siguiendo las instrucciones del fabricante. Este Kit es utilizado en el Instituto GEUS, (Copenhague, Dinamarca), donde durante mi estancia breve allí en el periodo de mi Tesis pude aprender su correcta utilización.

La cantidad de ADN extraído en los 10 suelos se midió en el equipo Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (programa, ND-1000 3.8.1), no resultando suficiente, en general, para poder realizar una amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Por ello, se realizó rutinariamente un protocolo de concentración del ADN de cada suelo estudiado. En primer lugar se añadieron al ADN extraído de cada suelo 5 µL de acetato sódico (3M) y 125 µL de etanol al 100 %. Se dejó a -20 °C durante 24 horas. Posteriormente, se centrifugó 20 minutos a 14000 rpm

en centrífuga Eppendorf 5424. A continuación, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μL de etanol al 70%. Se volvió a centrifugar durante 5 min a 14000 rpm, se decantó de nuevo y se dejó secar a temperatura ambiente durante 1 hora. Por último, cada ADN se resuspendió en 24 μL de agua Sigma (agua libre de nucleótidos, *Water for Embryo transfer*; Sigma-Aldrich) a 65 °C y se conservó a -20 °C.

3.2.8.4 Amplificación mediante PCR de genes que codifican para enzimas de la ruta metabólica de degradación de Diurón

Para la identificación de genes que codifican las enzimas degradadoras de Diurón en *A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli* se realizó PCR utilizando las condiciones y los *primers* descritos por Bers y col. (2011) para estudiar la ruta metabólica de degradación de linurón.

Para ello, se utilizó un termociclador iCycler™ (BioRad, Hercules, California, EEUU). Las reacciones se prepararon en tubos de PCR de 0,2 mL y se componían de 1 μL de solución ADN molde y de 50 μL de la misma mezcla de reacción. La composición de la mezcla de reacción fue de 750 μL de agua libre de nucleótidos (*Water for Embryo transfer*; Sigma-Aldrich), 100 μL de *Buffer* de PCR (Biotools, Madrid), 30 μL MgCl_2 (Biotools), 100 μL dNTPs (Bioline, Massachussets, EEUU; 100 mM), 10 μL de cada *primer* (50 μM) de la pareja y 5 μL enzima Taq polimerasa (Biotools; 5 unidades μL^{-1}) equivalente a 25 unidades de enzima. Se usaron en todos los casos controles negativos sin ADN. Los *primers* empleados se muestran en la Tabla 2.12.

Todos los *primers* empleados para PCR se disolvieron en agua Sigma libre de nucleótidos para preparar un stock de 50 μM utilizándose diferentes *primers* (Invitrogen, Carlsbad, California) en función del organismo y del gen diana.

El protocolo de amplificación comprendió un ciclo de desnaturalización (94 °C durante 5 minutos), seguido de 30 ciclos de desnaturalización (94 °C durante 1minuto), hibridación de los *primers* (50 °C durante 1minuto), elongación (72 °C durante 1 minuto) y un ciclo de elongación final (72 °C durante 10 minutos).

Para confirmar el resultado positivo de las amplificaciones por PCR, los productos de estas reacciones fueron visualizados en electroforesis en gel de agarosa (SeaKem®, CAMBREX Bio Science Rockland, New York, EEUU) al 1 % (p/v), observados en transiluminador y fotografiados utilizando el programa “Kodak 1D Image Analysis Software®” como se describe en el apartado 3.2.8.2.

Tabla 2.12. *Primers empleados en las reacciones de amplificación por PCR de genes degradadores específicos de Diurón.*

PRIMER ⁽¹⁾	Tm (°C)	GC (%)	Secuencia	Gen	Tamaño del producto de PCR (pb)
puhBf ⁽²⁾	60,5	55	5'-CGGACGTTCTAGACCGTAT-3'	Puh B	100-200
puhBr	61,3	52,4	5'-CGCGATCTTGAGCATGTCTAC-3'		
puhAf ⁽²⁾	58,4	50	5'-ACCGTGTTTCGACACGTACAA-3'	Puh A	100-200
puhAr	57,3	52,6	5'-GCCCGATGAAGTGGAATC-3'		
LinAmidR-F ⁽³⁾	64	54,5	5'-TGCTGCAAGCTCTCTTTGCCCT-3'	Lib A	1400
LinAmidR-R	66,4	56,5	5'-CCAACATCTGACCCCGGTGTTT-3'		
LinAmid8F ⁽³⁾	64,6	65	5'-AGCGCACATGACGCCACTGG-3'	Lib A	200
LinAmid8R	64,6	65	5'-AGGGTCCAGCCTGCGGACAA-3'		
ccdC-F ⁽³⁾	58,4	50	5'-TGGAGGGCCCTATTTCTA-3'	Ccd C	425
ccdC-R	58,4	50	5'-ACTGTCGACCCACTTCTCAT-3'		
ATG-F ⁽³⁾	61,1	43,5	5'-YBTCDTGCCGGAYCARTAYGG-3'	Dca Q	272
ATG-R	60,1	37,5	5'-CATGTAVAGRTCRGCNARCATCCA-3'		
dcaQ-F ⁽³⁾	58,4	50	5'-CTCTCATGGCCGGATCAATA-3'	Dca Q	272
dcaQ-R	60,5	55	5'-TACAGATCGGCCAGCATCCA-3'		

⁽¹⁾ Los *primers* indicados con F se refieren al *primer* en sentido *forward*, aquellos con R se refieren a *primers* antisentido *reverse*.

⁽²⁾ Pesce y col. (2012).

⁽³⁾ Bers y col. (2011).

3.2.9. Estudios de estimación de riesgo en suelos contaminados por Diurón

3.2.9.1. Extracciones de Diurón con diferentes extractantes

A tiempo 0 días y a determinados intervalos de tiempo de envejecimiento (15, 30, 60 y 100 días) se tomaron muestras de cada uno de los 10 suelos anteriormente descritos (Tabla 2.1) que habían sido contaminados artificialmente para obtener concentraciones de Diurón de 5 y 50 mg kg⁻¹, los cuales habían sido previamente esterilizados. Las muestras fueron congeladas hasta el momento de ser analizadas. Después de los 100 días se llevaron a cabo tres extracciones con 3 extractantes de distinta hidrofobicidad: una solución de CaCl₂ (10 mM), una solución HPBCD a una concentración 10 veces la concentración de Diurón (para los suelos contaminados

con 50 mg kg⁻¹) y 100 veces la concentración del herbicida (para los suelos contaminados con 5 mg kg⁻¹) y butanol. Para ello, se colocaron 2 g de suelo contaminado en tubos de centrifuga de 30 mL de capacidad, y posteriormente, se añadieron 5 mL de cada extractante. Los tubos se mantuvieron en agitación orbital a 120 rpm a 20 ± 1 °C durante 24 horas. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas (a 11000 rpm durante 10 minutos y 20 ± 1 °C de temperatura) y el sobrenadante se analizó por HPLC para detectar la cantidad de Diurón extraído.

Para saber qué concentración de HPBCD se debía añadir en los estudios para formar el complejo de inclusión entre la molécula de Diurón y HPBCD se realizó un ensayo previo con las dos concentraciones del herbicida empleadas, 5 y 50 mg kg⁻¹. Este estudio se realizó en dos suelos seleccionados por su diferencia en el contenido en MO para que los resultados obtenidos pudieran ser aplicados a todos los suelos empleados. Estos suelos fueron: FH y CR. La metodología utilizada fue la misma que se ha descrito anteriormente para los estudios de extracción, pero utilizando concentraciones de HPBCD x10, x100, x500 y x1000 veces superior a la concentración de Diurón.

Los estudios de mineralización realizados en los 10 suelos (Tabla 2.10, ensayo 21) se correlacionaron con las cantidades de Diurón extraído a 50 mg kg⁻¹ por los diferentes extractantes, anteriormente usados, para confirmar con el objetivo de estudiar el efecto del envejecimiento del contaminante en la mineralización mediante la inoculación de dicho consorcio bacteriano degradador específico para Diurón y la biodisponibilidad del herbicida en el suelo a lo largo del tiempo. Los suelos en los estudios de mineralización también fueron esterilizados al empezar y fueron conservados en condiciones donde no se perdió la esterilidad para asegurar que el herbicida Diurón añadido permaneció a lo largo de todo el experimento.

3.2.9.2. Estudios de toxicidad para plantas

Con el fin de evaluar la toxicidad de Diurón sobre un cultivo y su correlación con las características de distintos suelos, se contaminaron los 10 suelos con Diurón a 5 mg kg⁻¹ y con un 40% de humedad. Los suelos, previamente autoclavados, se recogieron a diferentes tiempos y se congelaron hasta el momento de ser utilizados en los estudios de toxicidad. Así, se aseguraba que la totalidad de Diurón agregado estaba presente desde el inicio del ensayo. Los tiempos de envejecimiento fueron 0, 15, 30, 60 y 100 días.

Una vez pasados 100 días de envejecimiento se procedió a la preparación de las macetas por quintuplicado. En cada maceta de plástico se pesaron 15 g de suelo contaminado con 5 mg kg⁻¹ de Diurón. A continuación, se plantaron 5 semillas de cebada (*Hordeum vulgare*). Las muestras así

preparadas fueron trasladadas a una cámara de cultivo de la casa Binder, modelo KBWF 720, a 20 ± 1 °C con un periodo de 12 horas de luz. Fueron regadas diariamente. La actividad del herbicida se determinó tras 12 días después de la siembra, midiendo los porcentajes de inhibición del peso, talla y número de semillas respecto a un ensayo control sin la presencia del herbicida.

Los estudios de toxicidad realizados en los 10 suelos se correlacionaron con las cantidades de Diurón extraído a 5 mg kg^{-1} por los diferentes extractantes, anteriormente usados, para estimar el riesgo tóxico que puede presentar la presencia del herbicida Diurón en los tiempos de envejecimiento del experimento.

Dentro de este apartado, también se ha evaluado el efecto que ejerce el exudado de las raíces de la cebada como extractante del herbicida Diurón envejecido en suelos. Para ello, se sembraron por triplicado 10 semillas en macetas de plástico sobre algodón, las cuales fueron regadas diariamente durante 10 días en una cámara de cultivo de la casa Binder, modelo KBWF 720, a 20 ± 1 °C con un periodo de 12 horas de luz. Pasado estos días se recogió el exudado y se realizaron las extracciones en los suelos CRF, PLD, AL y FH de la misma manera que se realizó con butanol, HPBCD y CaCl_2 (apartado 3.2.9.1).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD DE DIURÓN EN PRESENCIA DE DISTINTAS CICLODEXTRINAS

A la hora de abordar el estudio de la formación de complejos de inclusión entre ciclodextrinas (CDs) y la molécula de un determinado compuesto, principalmente de carácter hidrofóbico, los estudios basados en diagramas de solubilidad son planteados como paso inicial a la hora de determinar los parámetros de complejación que reflejan la interacción entre la cavidad de la CD y del compuesto a estudiar. En nuestro caso, se emplearon varios tipos de CDs, tanto naturales como sintéticas, siendo la diferencia más importante entre ellas las diferentes dimensiones de la cavidad hidrofóbica, donde se alojará la molécula del herbicida, así como el tipo de sustituyentes en el caso de las CDs sintéticas empleadas.

Diagramas de solubilidad de fases de Diurón con las diferentes CDs

Los diagramas de solubilidad obtenidos para Diurón con las CDs naturales empleadas (BCD y GCD) y con las CDs sintéticas (RAMEB, HPBCD y HPGCD) se representan en la Figura 4.1. La α -CD no fue usada en este trabajo porque hay estudios previos que explican que existen impedimentos estéricos entre un herbicida con las dimensiones moleculares del Diurón y la cavidad de esta CD (4,7-5,3 Å), lo que dificultaría la entrada del herbicida obteniendo una baja constante de complejación (K_c) (Villaverde y col. 2005a).

Observando los cinco diagramas de solubilidad correspondientes a las cinco CDs estudiadas, se observa un claro incremento lineal en la solubilidad del herbicida con el aumento en la concentración de CD, no llegándose a alcanzar un límite de solubilidad en el rango de concentraciones empleadas, salvo en el caso de RAMEB. En este diagrama se observa que la solubilidad de Diurón aumenta linealmente hasta alcanzar un límite definido, a partir del cual comienza una meseta cuya extensión dependerá del exceso de CD añadida. Este comportamiento corresponde claramente a un diagrama de solubilidad tipo B_s de Higuchi y Connors (1965). Este tipo de diagrama es el resultado de la formación de un complejo herbicida-CD de solubilidad limitada. Ello se refleja en la presencia de una zona de meseta, donde la solubilidad del herbicida alcanza su máximo y donde posteriores adiciones de CD conducen a una precipitación del complejo formado.

Para las otras cuatro CDs, de acuerdo con la clasificación de Higuchi y Connors (1965), se trata de diagramas de solubilidad del tipo A_L , siendo el aumento de solubilidad consecuencia de la formación de un complejo de inclusión entre el herbicida Diurón y las diferentes CDs empleadas. El hecho de que los diagramas sean líneas rectas con pendientes menores a 1 indica que los complejos formados en solución presentan una estequiometría 1:1.

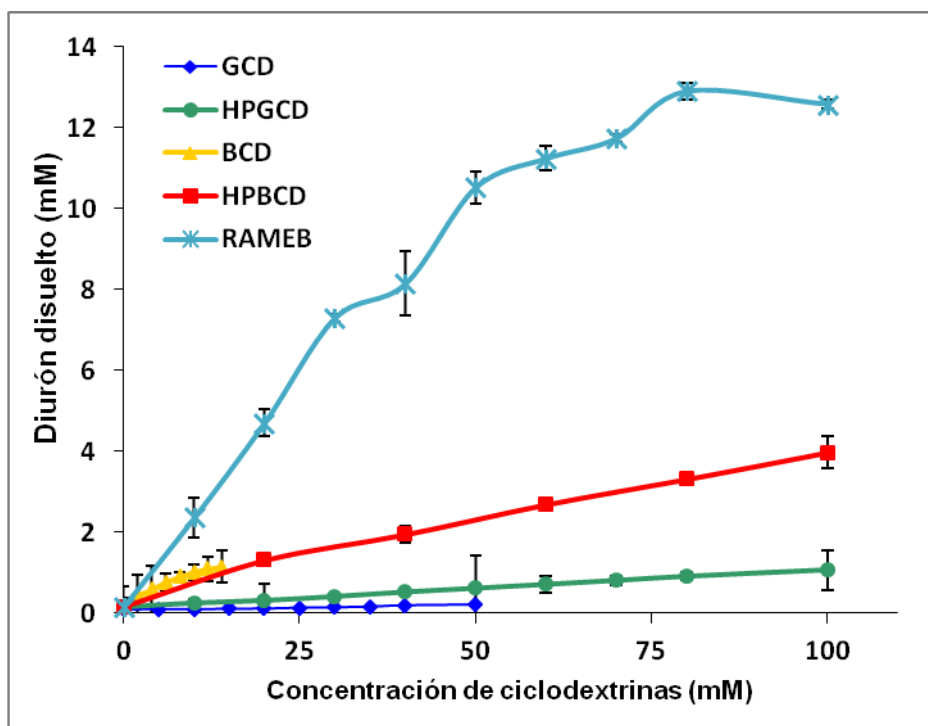


Figura 4.1. Diagramas de solubilidad de Diurón en presencia de las CDs naturales (BCD y GCD) y de las CDs sintéticas (RAMEB, HPBCD y HPGCD).

Las constantes de estabilidad aparentes de formación de dichos complejos (K_c) y las eficacias solubilizante (S_e) fueron calculadas según la ecuación de Higuchi y Connors (1965), descritas en el apartado de Materiales y Métodos de la presente memoria, y cuyos valores se incluyen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Constantes de complejación (K_c , M^{-1}), eficacia solubilizante (S_e), y coeficientes de correlación (R^2) obtenidos a partir de los ensayos de solubilidad para los complejos de inclusión de Diurón en solución y en presencia de GCD, BCD, HPGCD, HPBCD y RAMEB.

Ciclodextrinas	Diurón		
	S_e	K_c	R^2
GCD	2,27 (\pm 0,36) ^a	25,7 (\pm 2,9)	0,99
HPGCD	6,79 (\pm 0,88) ^b	58,7 (\pm 1,1)	0,93
BCD	6,76 (\pm 1,02) ^a	176 (\pm 4)	0,96
HPBCD	23,3 (\pm 1,3) ^b	208 (\pm 4)	0,98
RAMEB	73,5 (\pm 0,9) ^b	670 (\pm 2)	0,89

a, b para concentraciones de CD 0,01 y 0,1 M, respectivamente.

El estudio comparado de las constantes de complejación (K_c) y de las eficacias solubilizantes (S_e) obtenidas muestra diferencias, observándose que los valores más altos se obtuvieron cuando se

empleó la CD de origen sintético RAMEB (K_C : 670 M^{-1} y S_e : 73,5). Seguidos a estos valores fueron obtenidos cuando se emplearon HPBCD y BCD (208 M^{-1} y 176 M^{-1} , respectivamente).

Es importante destacar que el tamaño de la cavidad de las CDs resultó determinante para la efectividad del proceso de complejación. Debido al mayor diámetro interno de la cavidad de la GCD y de su CD sintética HPGCD, se produciría un proceso fácil tanto de entrada como de salida de la molécula huésped, lo que se traduce en un valor menor de K_C para la formación de los complejos en solución, resultando ser los datos más bajos de las cinco CDs estudiadas (K_C : $25,7 \text{ M}^{-1}$ y K_C : $58,7 \text{ M}^{-1}$, para GCD y HPGCD, respectivamente).

Hay que indicar que aunque la constante de complejación de BCD es alta (176 M^{-1}), lo que indica que existe una gran tendencia a formar un complejo de inclusión con el Diurón, la eficacia solubilizante fue baja debido a su baja solubilidad en agua (16 mM) (Villaverde y col. 2012).

En resumen, el estudio comparativo de los diagramas de solubilidad de fases y el cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos Diurón-ciclodextrinas obtenidos en medio acuoso, permiten predecir cuál de ellas sería la mejor para ser utilizada en la descontaminación de suelos, poniendo de manifiesto la siguiente secuencia: RAMEB>HPBCD>BCD>HPGCD>GCD.

Modelo matemático aplicado a los complejos de inclusión

El objetivo de este estudio es corroborar los resultados experimentales obtenidos en el ensayo de solubilidad comentado anteriormente con los cálculos de un modelo de complejación molecular empleando el servicio web “Cyclodextrin KnowledgeBase” (<http://www.cyclodextrin.net>). Los resultados obtenidos a partir de modelizaciones moleculares se basaron en la obtención de complejos de inclusión de mínima energía (Hazai y col. 2010). Otras investigaciones se han llevado a cabo con el fin de obtener información acerca de las fuerzas que conducen a la asociación de una molécula en la cavidad de la CD. Morillo y col. (2012) llevaron a cabo estudios de modelización de complejos de inclusión CDs-PAHs empleando Hyperchem software, versión 8.0.8 (Hyperchem 8.0.8, 2009), pero las estructuras de las CDs fueron construidas bajo las indicaciones del servicio web “Cyclodextrin KnowledgeBase”. Bikádi y col. (2006) realizaron la modelización molecular de complejos de CDs-carotenoides, con el programa GROMAC (Berendsen y col. 1995).

Los modelos moleculares de cada CD con el herbicida aparecen representados en la Figura 4.2, obtenidos a partir de la herramienta de acoplamiento molecular incluido en “Cyclodextrin KnowledgeBase”. Las energías libres de enlaces de Diurón con las diferentes CDs estudiadas y la superficie de contacto están indicadas en la Tabla 4.2.

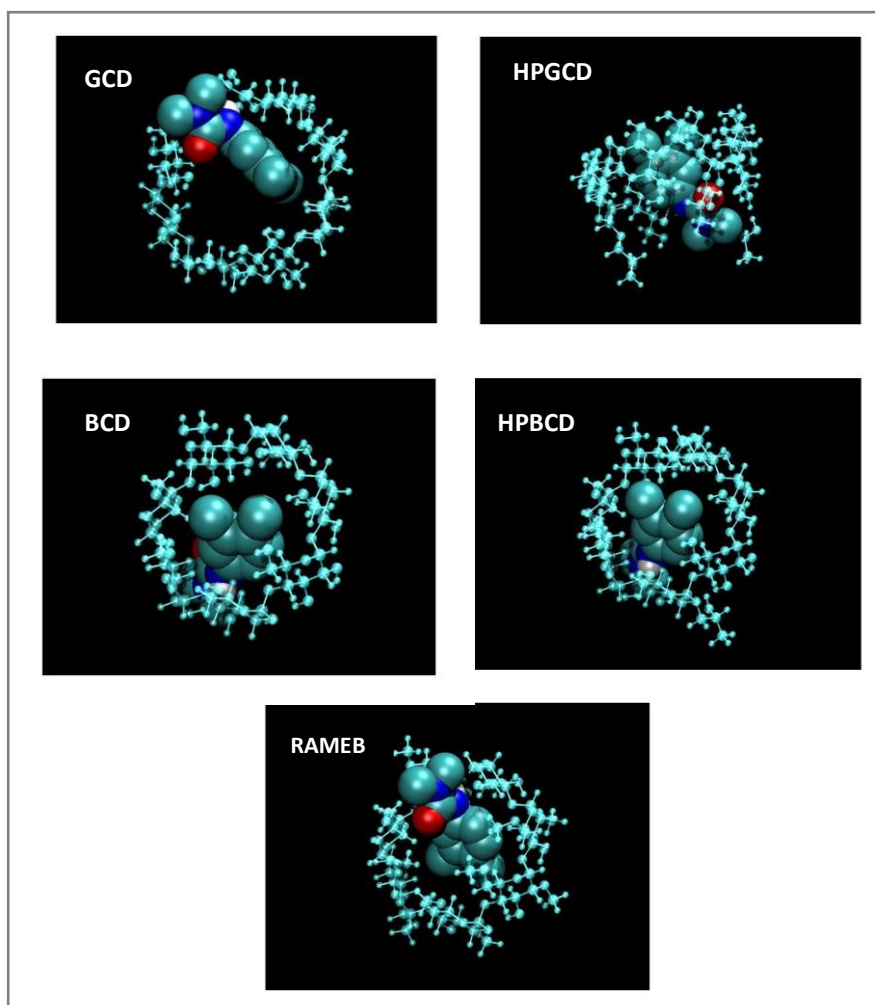


Figura 4.2. Estructuras más estables de los complejos de Diurón con cada una de las CDs investigadas (GCD, HPGCD, BCD, HPBCD y RAMEB) obtenidas a partir del modelo de complejación incluido en "Cyclodextrin KnowledgeBase".

Tabla 4.2. Energía libre de enlace y la superficie de contacto en los complejos de inclusión formados entre las diferentes CDs y la molécula de Diurón según el modelo de complejación incluido en "Cyclodextrin KnowledgeBase".

COMPLEJO DE INCLUSIÓN	Energía libre de enlace (Kcal mol ⁻¹)	Superficie de contacto (Å ²)
GCD-DIURÓN	-4,29	473,2
HPGCD-DIURÓN	-4,66	526,2
BCD-DIURÓN	-5,15	486,4
HPBCD-DIURÓN	-5,35	532,7
RAMEB-DIURÓN	-5,62	546,0

Para los 5 complejos de inclusión formados con Diurón la energía libre de enlace fue negativa, lo que indica que la complejación está favorecida energéticamente. Los valores de K_c (Tabla 4.1) están relacionados con esta energía libre de enlace inversamente, es decir, cuanto más alta es la

K_c menor es esta energía. De acuerdo con Wenz y col. (2006), las principales fuerzas responsables de la formación de complejos de inclusión con CD son interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van der Waals entre la superficie interna del anillo de la CD y los sitios hidrofóbicos de la molécula huésped, por lo que una mayor superficie de contacto implica una mayor interacción. Las superficies de contacto se pueden observar en la Figura 4.2 y en la Tabla 4.2, donde se aprecia claramente que los complejos de inclusión entre la molécula de Diurón y las ciclodextrinas muestran los valores más altos (526,2, 532,7 y 546,0 en HPGCD, HPBCD y RAMEB, respectivamente) debido a las interacciones con los sustituyentes de cada una de estas ciclodextrinas.

Con este modelo matemático para complejos de inclusión se corrobora que HPBCD es capaz de formar un complejo de inclusión altamente estable con el herbicida Diurón desde un punto de vista termodinámico. Aunque los mejores resultados de complejación se obtuvieron en el caso de la CD RAMEB, en los siguientes estudios llevados a cabo en esta memoria se empleó HPBCD cuyo resultado en los diagramas de solubilidad presentó el segundo mejor efecto solubilizante con el herbicida Diurón. Esta decisión fue tomada ya que desde un punto de vista medioambiental existen publicaciones que indican su menor capacidad por adsorberse sobre el suelo (Badr y col. 2004) y hace más disponible a los microorganismos del suelo los contaminantes orgánicos (Reid y col. 2000; Allan y col. 2006). De acuerdo con Wang y Brusseau (1993) y Fenyvesi y col. (1996) HPBCD es un buen agente solubilizador de contaminantes orgánicos del suelo, tales como PAHs, contaminantes organoclorados (Boving y Brusseau, 2000), disolventes orgánicos (tricloroetano y clorobenceno) o insecticidas organoclorados como p,p'-DDT, ya que mejora la solubilidad de éstos en un orden de magnitud de entre 1 y 3 dependiendo del tamaño y la forma del soluto. Otras razones por las que se eligió HPBCD fueron porque presenta una menor toxicidad, y es la CD sintética más económica, debido a su extendido uso avalado por numerosas publicaciones científicas donde se postula su empleo en la recuperación de suelos contaminados (Vrielynck y col. 2003; Morillo y col. 2012; Benfeito y col. 2013; Villaverde y col. 2013a, b).

4.2. ADSORCIÓN-DESORCIÓN DE DIURÓN EN COMPONENTES COLOIDALES Y EN SUELOS

Una vez que se ha puesto de manifiesto la formación de complejos de inclusión entre el herbicida Diurón y las distintas CDs seleccionadas en el apartado anterior, se va a proceder al estudio del comportamiento del herbicida, primero en presencia de diferentes componentes coloidales (apartado 4.2.1) y a continuación en 7 suelos con diferentes propiedades físico-químicas (apartado 4.2.2).

4.2.1. Adsorción-desorción de Diurón en componentes coloidales

Se han llevado a cabo experiencias de adsorción-desorción del herbicida en sistemas cerrados (batch) sobre los componentes coloidales más representativos del suelo: ácido húmico (AH), goetita (GT) y montmorillonita (M), como materiales representativos de materia orgánica, óxidos y minerales de la arcilla. En la Figura 4.3, se muestran las isothermas de adsorción del herbicida Diurón en presencia de dichos componentes coloidales.

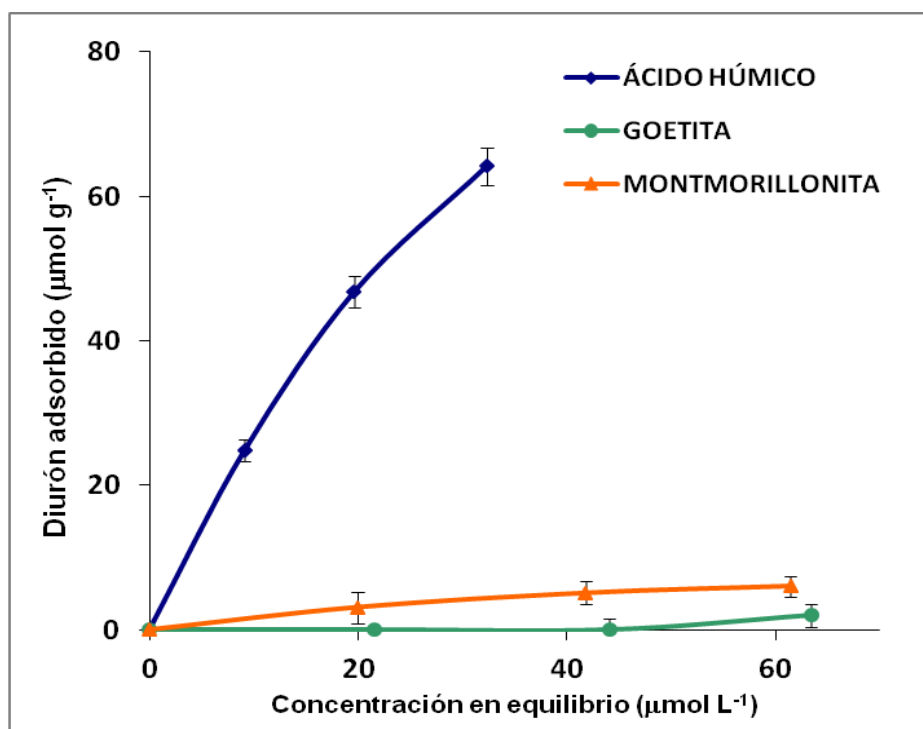


Figura 4.3. Isothermas de adsorción de Diurón en los distintos componentes coloidales.

Se observa claramente la mayor capacidad de adsorción que muestra el AH, seguido a gran distancia por la M. Este resultado se ajusta a aquellos observados en la literatura donde, en general, para los herbicidas poco polares como es el Diurón, se ha determinado que las interacciones de tipo hidrofóbicas son las predominantes (Wang y Keller, 2009; Giacomazzi y Cochet, 2004; Kasozi y col. 2010). Salvestrini (2013) concluyó en un estudio con AH y AH de bajo peso molecular y Diurón que los factores estéricos influían en la actividad catalítica ya que reducen impidiendo la accesibilidad de Diurón para adsorberse en los AH.

En el caso de la GT, la adsorción del herbicida fue nula, deduciéndose la importancia de la presencia de un mayor o menor contenido en materia orgánica en los suelos respecto a la adsorción y disponibilidad de este herbicida, así como para su lixiviación en el suelo o para ser biodegradado, siendo estos dos últimos procesos los más importantes respecto a las pérdidas que frecuentemente sufren los herbicidas una vez que son aplicados sobre un suelo agrícola. La

cantidad de Diurón adsorbido sobre AH y M se muestra en la Tabla 4.3, indicando que la adsorción es de 8 a 11 veces mayor en el AH que en la M. Los experimentos de desorción de Diurón usando una solución acuosa 0,01 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sólo se realizaron en los componentes donde hubo adsorción (AH y M). En los dos casos, el comportamiento de desorción se desvió notablemente con relación a las isothermas de adsorción (figura no mostrada), lo cual indica que la adsorción de Diurón en estos componentes coloidales no es completamente reversible. El Diurón es un herbicida muy persistente en suelos con alto contenido en MO o en minerales de la arcilla (Villaverde y col. 2013a).

Tabla 4.3. Cantidad de Diurón adsorbido y porcentaje de Diurón desorbido frente a 2 componentes coloidales estudiados: AH y M.

	Concentración de Diurón inicial (mg L^{-1})	Diurón adsorbido ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	% de Diurón desorbido con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$
AH	5	24,8 ($\pm 2,35$)	30,1 ($\pm 0,55$)
	10	46,5 ($\pm 1,44$)	35,3 ($\pm 1,00$)
	15	64,1 ($\pm 3,50$)	36,6 ($\pm 0,89$)
M	5	3,12 ($\pm 0,23$)	83,6 ($\pm 2,22$)
	10	4,79 ($\pm 0,55$)	92,9 ($\pm 3,56$)
	15	5,92 ($\pm 0,98$)	96,8 ($\pm 2,45$)

En la Tabla 4.3, también se presenta el porcentaje de Diurón desorbido. En general, el Diurón adsorbido en los componentes coloidales seleccionados es ligeramente más irreversible (menor porcentaje de desorción) a menor concentración de Diurón adsorbido (5 mg L^{-1}); es decir, la molécula de Diurón está más fuertemente adsorbida a los puntos de adsorción de alta energía y su desorción, por tanto, es más difícil, como ha sido previamente estudiado con otros herbicidas (Morillo y col. 2002; Undabeytia y col. 2004).

Para el herbicida en presencia del AH se observa una cierta desorción. Los % de desorción calculados para las concentraciones iniciales 5, 10 y 15 mg L^{-1} fueron de un 30,1, 35,3 y 36,6 %, respectivamente, lo que indica la importancia, en la retención de este herbicida, de un mayor o menor contenido de materia orgánica en los suelos. Por el contrario, se observó un elevado porcentaje de desorción en el caso de la M, alcanzándose casi el 100% (96,8%) cuando la concentración inicial empleada fue la más alta (15 mg L^{-1}). Esto indica que en suelos con bajo

contenido en MO y en presencia de un alto contenido en minerales de la arcilla puede ser más fácil la pérdida de Diurón provocando un aumento de la contaminación ambiental.

Por la baja volatilidad que presenta el herbicida estudiado y por su gran capacidad de adsorberse sobre la MO del suelo, Diurón se encuentra prácticamente asociado a la fase sólida más que en la fase líquida o gaseosa. Muchos estudios de adsorción de Diurón corroboran que la adsorción de este herbicida está directamente relacionada con la presencia de MO en suelos (Inoue y col. 2009; Kasozi y col. 2010). Wang y Keller (2009), realizaron estudios de adsorción-desorción de Diurón en las distintas fracciones del suelo (arcilla, limo y arena) concluyendo que, debido a su contenido en MO, la fracción arcilla fue mucho más efectiva para la adsorción del herbicida que el limo o la arena, así como las moléculas del herbicida mostraron la mayor resistencia a ser desorbidos.

4.2.2. Adsorción-desorción de Diurón en suelos. Efecto de la adición de HPBCD

4.2.2.1. Isotermas de adsorción de Diurón

En la Figura 4.4 se presentan las isotermas de adsorción del herbicida Diurón sobre los suelos empleados. En todos los casos las isotermas de adsorción de cada suelo se ajustaron a la ecuación de Freundlich, como lo confirman los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos (Tabla 4.4).

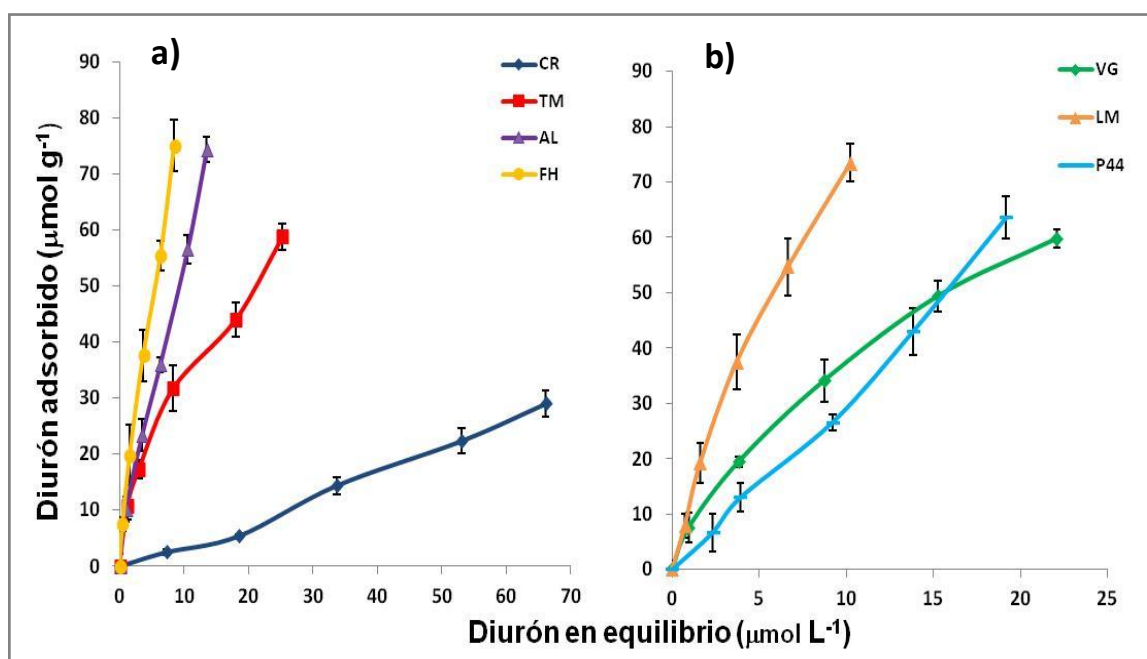


Figura 4.4. Isotermas de adsorción de Diurón en los suelos estudiados.

Tabla 4.4. Parámetros de la ecuación de Freundlich (K_f y n), coeficientes de correlación (R^2) y K_f normalizada con el contenido de carbono orgánico (K_{foc}) correspondientes a la adsorción de Diurón sobre los distintos suelos empleados.

Suelos	MO	K_f	n	R^2	K_{foc}
FH	3,37	13,0	0,81	0,93	664
AL	2,13	13,8	0,66	0,91	1112
TM	1,76	13,2	0,54	0,99	877
VG	1,75	6,49	0,67	0,91	638
P44	1,56	2,90	1,04	0,97	320
LM	1,41	14,3	0,70	0,95	1738
CR	0,20	0,60	0,90	0,95	516

MO: Materia orgánica (%).

Las isotermas de adsorción fueron comparadas usando el parámetro K_f de la ecuación de Freundlich. La constante de K_f es la cantidad de herbicida adsorbido para una concentración en el equilibrio de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ y por lo tanto, representaría la capacidad de adsorción de un suelo a concentraciones bajas del adsorbato. En nuestro caso, y para nuestro herbicida correspondería a un escenario de aplicación normal sobre suelos agrícolas ($0,6\text{-}5 \text{ kg ha}^{-1}$, Tomlin, 2000), es decir, esta capacidad de adsorción determinada a través de K_f nos aportaría información sobre el comportamiento del herbicida, cuando este es aplicado para llevar a cabo su función biológica. En los suelos estudiados K_f varió entre 0,60 y 14,3, suelo CR y LM, respectivamente (Tabla 4.4), indicando una fuerte influencia de las propiedades del suelo sobre la adsorción de Diurón, algo esperable, ya que la adsorción representa el eje central del comportamiento y destino de un xenobiótico en el sistema suelo-agua.

Como se ha comentado en el apartado anterior, el contenido en MO se puede considerar como la propiedad más importante en la capacidad de adsorción de Diurón en suelos. En general, se observa una correlación entre el contenido en MO de los suelos estudiados y el valor de las respectivas K_f calculadas. Sin embargo, el suelo que presentó la mayor capacidad de adsorción de Diurón resultó ser el suelo LM ($K_f = 14,3$) a pesar de no ser el que posee mayor contenido en MO (1,41%). En el caso del suelo FH, el cual mostró el mayor contenido en MO, la adsorción no resultó ser la más alta ($K_f = 13,0$) siendo muy parecida ésta a la de los suelos AL y TM ($K_f = 13,8$ y $13,2$), los cuales presentan un porcentaje de MO de 1,58 y 1,91 veces menor que el suelo FH, respectivamente. Otros autores han observado resultados similares para este herbicida. La MO del suelo es una mezcla muy compleja y heterogénea de ácidos húmicos, lignina, polisacáridos,

proteínas, ácidos orgánicos, etc. (Sheng y col. 2001) pudiendo actuar de distinta forma a la hora de producirse la interacción entre el adsorbente y el adsorbato, por la diferente composición de dicha MO. Inoue y col. (2006) observaron un valor de K_f comprendido entre 5,99 a 9,33 en 6 suelos con diferentes propiedades físico-químicas correlacionándose los resultados con el contenido en minerales de la arcilla y MO. Morillo y col. (2004) obtuvieron para el herbicida norflurazona una K_f comprendida entre 0,35 y 93,04 $\mu\text{mol Kg}^{-1}$, indicando la fuerte influencia de las características de los 17 suelos empleados en la adsorción de este herbicida y a la vez que el contenido en MO de los suelos estudiados no era suficiente para explicar el comportamiento en la adsorción del herbicida. Igualmente, Arfaoui y col. (2012), observaron que para el herbicida isoproturon, perteneciente a la familia de las fenilureas, el contenido en MO y la razón $\text{CO}_3^{-2}/\text{MO}$ resultaron ser los dos parámetros más determinantes para su adsorción.

Otro parámetro determinado a partir de la ecuación de Freundlich es la constante de Freundlich (n), que nos indica la intensidad de la adsorción. Los valores obtenidos en estas isothermas de adsorción estuvieron comprendidos entre 0,54 y 1,04. Valores <1 indican que cuanto más cantidad de moléculas de Diurón se adsorben, menos sitios de alta afinidad existen, por lo que las isothermas empiezan a curvarse, es decir se aproximan más a isothermas tipo L de acuerdo a la clasificación de Giles y col. (1960).

El papel de las interacciones hidrofóbicas sobre la adsorción de los herbicidas hidrofóbicos y no polares puede ser comparado normalizando el coeficiente de Freundlich por el contenido en MO del suelo, K_{fOC} , pudiéndose concluir que además de ser responsable en la adsorción de Diurón, también esta interacción es fuerte y provoca una difícil desorción del mismo. Mientras más hidrofóbica sea una molécula más alta será la probabilidad para que se reparta desde la fase acuosa a la fase orgánica del medio. K_{fOC} puede ser utilizado como una medida de esta propiedad de los suelos y es independiente de otras. Cuando las uniones hidrofóbicas son las responsables de la adsorción del herbicida, K_{fOC} debe tomar valores más o menos constantes para los distintos suelos estudiados, es decir, se trata de un factor que sirve como herramienta para determinar si el factor que más influye en la adsorción de un plaguicida es la materia orgánica del suelo.

Los valores de K_{fOC} también vienen recogidos en la Tabla 4.4. Los valores obtenidos de K_{fOC} para los suelos investigados oscilaron entre 320 y 1738. En los suelos FH, TM, VG, P44 y CR los valores de K_{fOC} fueron 664, 877, 638, 320 y 516, respectivamente. Es decir, fueron valores muy similares entre ellos considerándose que el factor principal que influye en la adsorción del herbicida es el contenido en MO para estos 5 suelos. Sin embargo, hay dos suelos LM y AL, con valores más altos de K_{fOC} (1738 y 1112). Estos valores llevan a concluir que la adsorción del herbicida Diurón no depende solo del contenido en MO, es decir, no será la única propiedad de los suelos

responsable de la adsorción de Diurón sobre los 7 suelos estudiados. Estos valores fueron similares a aquellos obtenidos por otros autores. Inoue y col. (2006) obtuvieron valores de K_{OC} en un estudio de adsorción de Diurón y atrazina en 6 suelos entre 531 y 1567, sugiriendo esto que existía otro factor que influía en dicha adsorción y que resultó ser el contenido en arcilla. Carbo y col. (2007) en su estudio con tres herbicidas: acetamiprin, carbendazin y Diurón observaron que la adsorción de Diurón en dos suelos tropicales no se relacionó sólo con el contenido en MO (K_{fOC} para Diurón 145-2631), indicando esto que en la interacción del herbicida con los componentes minerales (sesquióxidos amorfos de Fe y Al y minerales de la arcilla 1:1) presentaban también una correlación con el coeficiente de adsorción.

Además de las propiedades ya presentadas en el apartado de Materiales y Métodos (Tabla 2.1), se han analizado los contenidos en óxidos amorfos de Fe, Al y Mn en estos suelos. En la Tabla 4.5 se muestran dichos óxidos amorfos correspondientes a los 7 suelos estudiados. A pesar de que el contenido en óxidos cristalinos en un suelo es mayor que el de óxidos amorfos, el área de estos últimos es mayor, pudiendo jugar este componente un papel muy importante en los procesos de adsorción. El suelo AL presenta un contenido extremadamente alto de óxidos amorfos de Fe, Al y Mn y también el suelo LM, el cual sin tener el mayor porcentaje de MO, presentó el valor más alto de K_{fOC} . En el caso del suelo FH a pesar de tener un alto contenido en óxidos amorfos, el mayor porcentaje de MO hizo que la K_{fOC} estuviera dentro de los valores normales encontrados por otros autores.

Tabla 4.5. Contenido en óxidos amorfos de Fe, Mn y Al de los suelos estudiados ($g\ Kg^{-1}$).

SUELOS	Fe_2O_3	MnO	Al_2O_3	OAT [*]
FH	5,95	5,41	12,6	24,0
AL	14,6	9,41	38,4	62,4
TM	1,56	2,12	0,47	4,15
VG	0,79	0,70	0,24	1,73
P44	2,23	0,66	0,49	3,38
LM	11,6	7,51	25,7	44,8
CR	0,16	0,15	0,08	0,39

^{*}OAT: Óxidos amorfos totales

En el estudio de Morillo y col. (2004) sobre la adsorción del herbicida norflurazona sobre 17 suelos con distintas propiedades y texturas, concluyeron que el contenido en MO no era la única propiedad que influía en la adsorción de este herbicida en el suelo sino que también respondió a

la variabilidad en la adsorción del herbicida, el contenido en óxidos amorfos de Al y Fe. Ghafoor y col. (2012) observaron en un estudio de adsorción de tres herbicidas valores de K_{fOC} en suelos que no tenían un alto contenido en MO, y lo atribuyeron al hecho de que los componentes inorgánicos tales como óxidos de Al y de Fe y los minerales de la arcilla contribuyeron significativamente en la adsorción de estos herbicidas en el suelo. Liu y col., (2013) explicaron en un estudio de adsorción de butacloro, que los óxidos amorfos podrían actuar como mediadores de los sitios activos de la materia orgánica y mejorar la adsorción de este herbicida en el suelo.

Para dilucidar qué parámetros son más relevantes a la hora de la adsorción de Diurón, se realizaron estudios de aproximación estadística con el programa IBM SPSS V.21. En este estudio estadístico por un lado, se incluyeron los 7 suelos estudiados y por otro, se analizaron los datos estadísticos sin los suelos LM y AL para confirmar si la adsorción de este herbicida en suelos dependía de otras propiedades de los suelos.

Las correlaciones bivariadas se reflejan en la Tabla 4.6 para los 7 suelos (a) y para los 5 suelos (b). En la Tabla 4.6 a, se observó cómo se correlacionó de forma significativa ($p < 0,05$) con el contenido en MnO de los suelos. Este hecho hace pensar que algunos de los suelos están alterando la correlación entre la adsorción y el contenido de MO porque están influyendo otras propiedades de los suelos. Si eliminamos el suelo AL y LM que son los dos que presentan mayor contenido en óxidos amorfos (OAT) y realizamos una correlación con los 5 suelos restantes (Tabla 4.6 b), K_f ahora sí se correlaciona positivamente con el contenido en MO confirmándose que el contenido en óxidos amorfos, especialmente MnO, influye en la adsorción de Diurón en suelos. En el caso de los suelos AL y LM, los OAT actúan favoreciendo la adsorción del herbicida a una capacidad de adsorción superior a la que deberían mostrar en función de su MO.

Tabla 4.6. Coeficientes de correlación entre diferentes propiedades de los suelos (MO, fracción arcilla, CO_3^{-2} , K_f , Fe_2O_3 , Al_2O_3 y MnO amorfos): **a)** Todos los suelos estudiados; **b)** Excepto los suelos LM y AL.

a)

MO	1						
Fracción arcilla	0,19	1					
CO_3^{-2}	-0,20	0,55	1				
Fe_2O_3	0,34	-0,14	-0,62	1			
Al_2O_3	0,31	-0,19	-0,58	0,99**	1		
MnO	0,46	-0,05	-0,056	0,98**	0,97**	1	
K_f	0,64	0,50	-0,15	0,70	0,67	0,81*	1
	MO	Fracción arcilla	CO_3^{-2}	Fe_2O_3	Al_2O_3	MnO	K_f

b)

MO	1						
Fracción arcilla	0,235	1					
CO ₃ ⁻²	-0,233	0,580	1				
Fe ₂ O ₃	0,902*	-0,038	-0,594	1			
Al ₂ O ₃	0,830	-0,167	-0,520	0,949*	1		
MnO	0,896*	0,159	-0,345	0,937*	0,946*	1	
K _f	0,898*	0,530	0,078	0,744	0,721	0,888*	1
	MO	Fracción arcilla	CO ₃ ⁻²	Fe ₂ O ₃	Al ₂ O ₃	MnO	K _f

*La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

La ecuación de regresión lineal automatizada obtenida aplicando el método de selección de modelos paso adelante y, empleando el criterio de entrada de valores $p < 0,05$ y de eliminación $p > 0,1$, incluyendo las propiedades analizadas de los 7 suelos investigados para K_f fue la siguiente:

$$K_f = 0,920 + 0,002 \text{ MnO (\%)} + 0,151 \text{ Fracción arcilla (\%)}$$

A parte de la relación que presenta K_f con los MnO en la ecuación de regresión lineal automatizada también aparece relacionado con la fracción arcilla, es decir en los 7 suelos los minerales de la arcilla influyen de manera positiva en la adsorción del herbicida. Otros autores confirman estos resultados. Liu y col. (2008), determinaron que la adsorción del herbicida butacloro en suelos, perteneciente a la familia de las sulfonilureas, dependía de la relación que exista entre el contenido en MO y los minerales de la arcilla. Wang y keller (2009), comentaron la fuerte adsorción de Diurón en la fracción arcilla, concluyéndose que en razones > 60 entre el contenido en minerales de la arcilla/MO la adsorción del herbicida se daría tanto sobre la MO como sobre la superficie de los minerales de la arcilla. Villaverde y col. (2008), observaron que tanto la MO como los minerales de la arcilla influyeron en la adsorción de cuatro herbicidas; 2,4-D, dicamba y dos sulfonilureas en 4 suelos, procedentes del sur de España, con un contenido en minerales de la arcilla mayor de 30 veces respecto al de MO.

La ecuación de regresión lineal automatizada obtenida para los 5 suelos siguiendo el mismo procedimiento indicado previamente para los 7 suelos estudiados, K_f fue la siguiente:

$$K_f = -0,373 + 4,032 \text{ MO (\%)}$$

Las variables significativas para los 7 suelos fueron el contenido en MnO y la fracción arcilla. En los 5 suelos la variable significativa fue sólo el contenido en MO.

La conclusión final que se obtiene a partir del estudio de las isothermas de adsorción de Diurón en los 7 suelos investigados con diferentes propiedades físico-químicas, es que la adsorción del herbicida Diurón en estos suelos no solo depende de la MO sino también, del contenido en óxidos amorfos totales en los suelos. Ambas propiedades fueron correlacionadas positivamente con la capacidad de la adsorción de estos suelos por el herbicida Diurón, es decir, que en suelos con un elevado contenido en OAT éste provocará una mayor adsorción de Diurón, que teniendo en cuenta únicamente el contenido en MO.

4.2.2.2. Isothermas de desorción de Diurón

En la Figura 4.5 se presentan las isothermas de desorción de Diurón de los 7 suelos estudiados empleando soluciones de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M. Las isothermas de desorción obtenidas fue posible describirlas mediante la ecuación de Freundlich.

La desorción de Diurón en los suelos presentó histéresis positiva en todos los casos, es decir, los resultados de desorción se desviaban marcadamente de aquellos correspondientes a las isothermas de adsorción, indicando que la adsorción de Diurón en suelos no era totalmente reversible. Villaverde y col. (2005a) y Morillo y col. (2004) observaron que las desorciones con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01M para el herbicida norflurazona presentaron una histéresis positiva, indicando que la desorción no era totalmente reversible, en especial en suelos con un alto contenido en MO y óxidos amorfos. Wang y Keller (2009), también observaron para los herbicidas atrazina y Diurón una histéresis positiva ($H > 1$) en los 4 suelos estudiados, así como en sus diferentes fracciones texturales.

En la Tabla 4.7 se muestran los porcentajes totales de Diurón desorbido (%D) a una concentración inicial de 10 mg L^{-1} cuando se empleó la solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M. En general, los porcentajes de desorción observados para cada suelo se correlacionan con los datos obtenidos de la adsorción, ya que cuanto mayor es la K_f , menor es el porcentaje de Diurón desorbido del suelo. Es decir, principalmente el contenido en MO es responsable de su comportamiento en la desorción de Diurón. Es de destacar el bajo porcentaje de Diurón desorbido en el caso del suelo LM (10,7%), el cual presentó un bajo contenido en MO (1,41%), pero un elevado contenido en óxidos amorfos totales ($44,8 \text{ g kg}^{-1}$) y, como se comentó en el apartado de adsorción (4.2.2.1) fueron estos últimos los que influían en la adsorción del herbicida en el suelo. Villaverde y col. (2005a) y Morillo y col. (2004) también explicaron que la desorción del norflurazona en 6 suelos dependía de otros factores, no solo del contenido en MO.

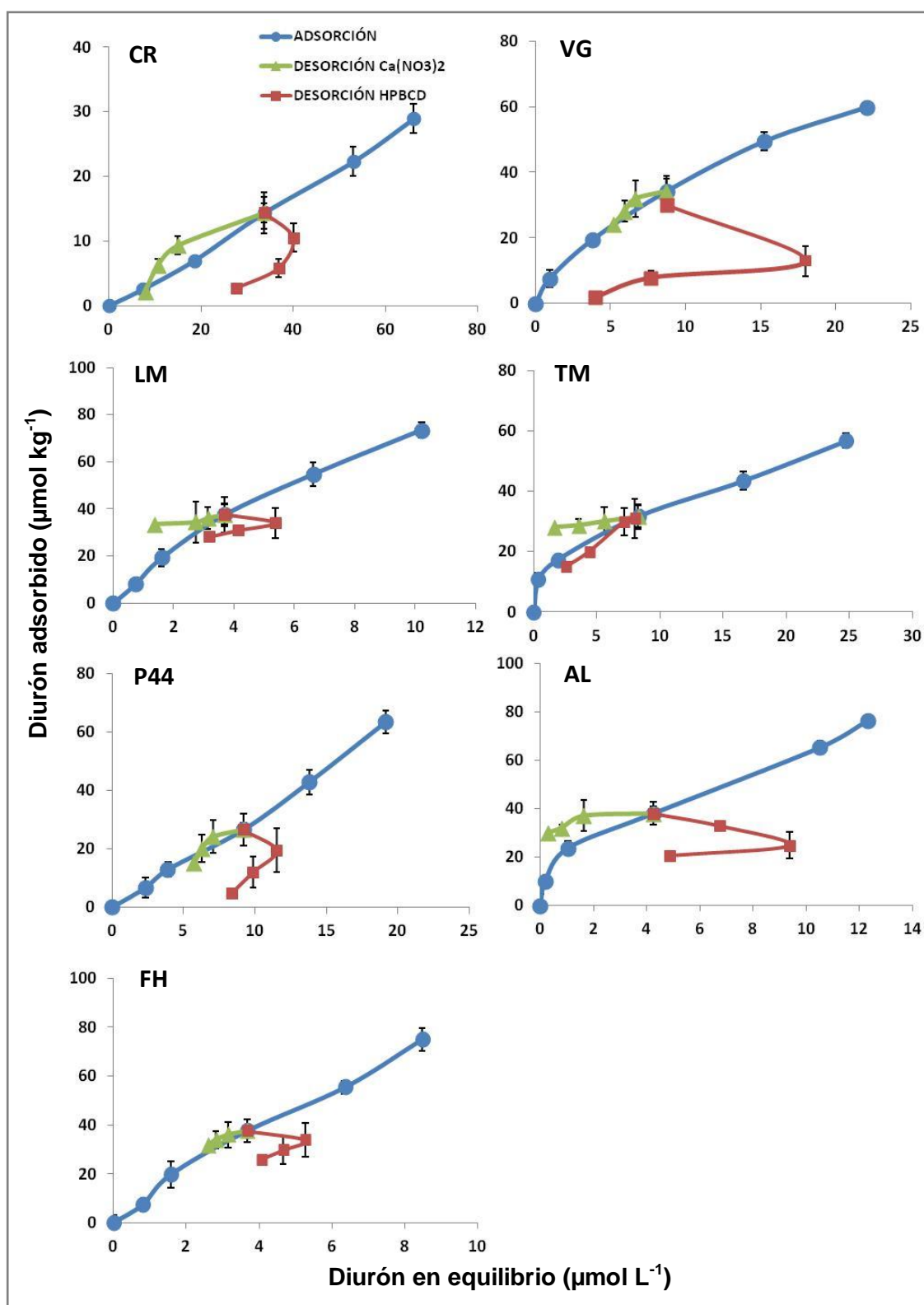


Figura 4.5. Isothermas de adsorción-desorción de Diurón empleando solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y una solución de HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida (10 mg L^{-1}) en los suelos estudiados.

Tabla 4.7. Porcentaje de Diurón desorbido de los suelos estudiados con una solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y una solución de HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida aplicada (10 mg L^{-1}) equivalente a 570 mg L^{-1} de HPBCD.

SUELOS	k_f	% DESORBIDO (10 mg L^{-1})	
		$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	HPBCD
FH	13,0	15,9	31,3
AL	13,8	20,1	45,8
TM	13,2	11,2	21,8
VG	6,49	29,5	93,3
P44	2,90	43,3	81,8
LM	14,3	10,7	25,1
CR	0,60	73,7	81,4

Antes de pasar a comentar los resultados de las isothermas de adsorción-desorción de Diurón empleando para desorber la solución de HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida (HPBCD x10) se pasará a comentar un estudio preliminar que se llevó a cabo con el objeto de determinar la menor cantidad de HPBCD que dieron los mejores resultados de extracción. En estos ensayos se empleó una concentración similar a la que se suele observar en una aplicación agrícola 5 mg kg^{-1} (equivalente a 5 kg ha^{-1}). Para ello, se utilizaron varias concentraciones de HPBCD, 0, 10, 100, 500 y 1000 veces la concentración molar del herbicida, en dos suelos de la Tesis (CR y FH) que presentaron las mayores diferencias respecto a las propiedades que resultaron ser responsable de la adsorción de Diurón para así poder extrapolar los resultados obtenidos a todos los suelos estudiados. En la Figura 4.6 se presentan los porcentajes de Diurón desorbido a las diferentes concentraciones de HPBCD mencionadas.

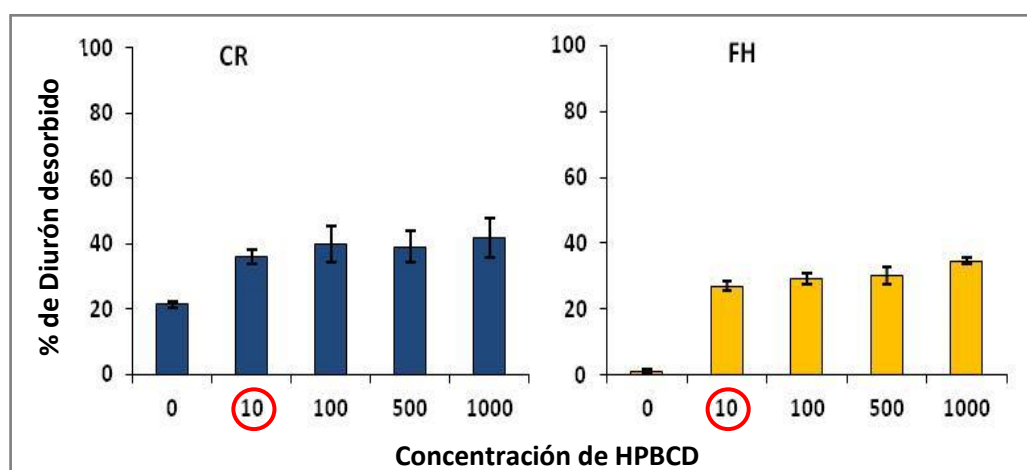


Figura 4.6. Porcentajes de Diurón desorbido cuando se empleó como solución extractante HPBCD a concentraciones de 0, 10, 100, 500 y 1000 veces la concentración molar del herbicida Diurón (5 mg kg^{-1}).

El efecto extractante de la solución de HPBCD a una concentración de 10 veces la concentración molar del herbicida (HPBCD x10), prácticamente fue similar a las concentraciones de HPBCD empleadas para ambos suelos, por lo que fue la concentración elegida. Villaverde y col. (2005a), realizaron un estudio de desorción para un herbicida organofosforado, norflurazona, en 6 suelos con características similares a los empleados en esta memoria. Emplearon un rango de concentración de BCD que oscilaba entre la cantidad equimolar y 150 veces la concentración molar del herbicida, observándose que con solo 10 veces la concentración molar de norflurazona se lograba alcanzar la máxima concentración extraída por la CD empleada.

En la Figura 4.5 también se muestran las isothermas de adsorción-desorción de Diurón empleando la solución de HPBCD 10 veces la concentración molar del herbicida. Se observa que en todos los casos existe también histéresis, ya que los resultados de desorción se desvían marcadamente de la isoterma de adsorción, pero se trata de una histéresis negativa, es decir, se desorbe más de la cantidad de Diurón de la que sería de esperar según la isoterma de adsorción.

En la Tabla 4.7 también se muestran los porcentajes totales de Diurón desorbido a partir de una concentración inicial de Diurón de 10 mg L^{-1} cuando se empleó la solución de HPBCD x10. El comportamiento observado indicó que el herbicida presenta una mayor tendencia a incorporarse a la solución del suelo en presencia de HPBCD y, por tanto, la capacidad de extracción de esta CD hacia el herbicida adsorbido. Similares resultados obtuvieron Pérez-Martínez y col. (2000) y Morillo y col. (2001) usando como extractante BCD en estudios de 2,4-D. Los herbicidas poco polares presentan una alta tendencia a permanecer adsorbidos en la superficie del suelo, conduciendo a su inactivación, baja biodisponibilidad y, por tanto, contaminación de los suelos, pero si éstos forman complejos de inclusión con las CDs en solución y aumentan su solubilidad, será más fácil eliminarlos facilitando la biorrecuperación de suelos contaminados (Villaverde y col. 2005a).

Al igual que en las isothermas de adsorción del herbicida, se realizaron estudios de aproximación estadística con el programa IBM SPSS V.21 con el objetivo de dilucidar que propiedades del suelo resultaban más significativas y por lo tanto, mejor describirán la capacidad de Diurón para ser desorbido desde las partículas del suelo. En este estudio estadístico se incluyeron los 7 suelos estudiados. Las correlaciones bivariadas se muestran en la Tabla 4.8.

Las desorciones con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y con la HPBCD x10 se correlacionaron negativamente con la K_f , es decir, cuando el suelo presenta una alta capacidad de adsorción por el herbicida éste mostró una mayor resistencia a ser desorbido. Asimismo, ambas desorciones se correlacionan negativamente con el contenido en MO, y sólo la desorción con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ resultó estar afectada de manera significativa por la presencia de MnO. En el caso de la desorción con HPBCD, los

coeficientes de correlación tanto con K_f como con MO son menores que las correspondientes a la desorción con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, y la influencia de MnO en la desorción de Diurón ya no resulta significativa en presencia de HPBCD.

Tabla 4.8. Correlaciones estadísticas entre diferentes propiedades de los suelos (MO, fracción arcilla, Fe_2O_3 , Al_2O_3 y MnO), K_f y los porcentajes desorbidos con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y con HPBCD (10 veces la concentración molar del herbicida) a una concentración inicial de Diurón añadido de 10 mg L^{-1} .

	K_f	MO	Fracción arcilla	Fe_2O_3	Al_2O_3	MnO
%Desorbido $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	-0,94**	-0,66*	-0,35	-0,80*	-0,75	-0,87*
%Desorbido HPBCD	-0,77*	-0,32*	-0,36	-0,53	-0,50	-0,65

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

En conclusión, las desorciones del herbicida Diurón son siempre más efectivas en presencia de HPBCD x10. Este fenómeno también ha sido observado por Pérez-Martínez y col. (2000) y Morillo y col. (2001) en el caso del herbicida 2,4-D, y también por Villaverde y col. (2005a) para el herbicida norflurazona. El hecho de que la desorción de Diurón de los distintos suelos sea mayor al emplear HPBCD se debe a que este herbicida tiende a formar un complejo de inclusión con la CD mediante el cual HPBCD actúa como un extractante de las moléculas de Diurón que están adsorbidas en los suelos.

4.3. LIXIVIACIÓN Y BIODEGRADACIÓN DE DIURÓN EN SUELOS. EFECTO DE LA ADICIÓN DE HPBCD

Aunque las técnicas de adsorción-desorción permiten evaluar mecanismos individuales de adsorción, estos resultados no pueden ser directamente extrapolados al régimen de flujo dinámico que se produce a través del suelo. Esto se debe a varios factores tales como la presencia de múltiples mecanismos de adsorción, las variaciones localizadas en la química de la solución y a la adsorción en condiciones de no equilibrio a lo largo del paso de flujo. Por ello se han realizado experiencias en columnas de suelo, que reflejan mejor estas condiciones reales. Este tipo de experimentos son de gran relevancia, ya que se encuentran directamente relacionados con el importante impacto medioambiental que pueden provocar este tipo de compuestos, los cuales pueden llegar a contaminar las aguas subterráneas si por sus características poseen un potencial alto para ser lixiviados.

Dos suelos, FH y CR, fueron seleccionados para el estudio de la movilidad de Diurón en columnas de suelos. La elección de estos suelos se realizó basándose en la adsorción que presentaron

respecto al herbicida así como por sus diferentes propiedades. Se escogió el suelo FH, que presentó una alta capacidad de adsorción ($K_f = 13,0$; $MO = 3,37\%$), y CR que mostró la menor capacidad de retención del herbicida ($K_f = 0,60$; $MO = 0,20\%$). El objetivo de este estudio fue detectar si en presencia de HPBCD el herbicida Diurón lixivia a zonas más profundas. En la fotografía de la Figura 4.7 se muestran las columnas de cada suelo con los dos tratamientos (con y sin la adicción de HPBCD x10) por duplicado. Cada columna fue empaquetada manualmente hasta obtener 16 cm de altura empleándose 125 g de suelo FH y 167 g de suelo CR. La cantidad añadida de Diurón a cada columna equivalía a 5 kg ha^{-1} . Como se observa en la Figura 4.7 se realizaron 4 replicados de columnas por cada suelo, a dos de los cuales, después de la aplicación del herbicida, se les añadió HPBCD a 10 veces la cantidad molar del herbicida aplicado en sólido (HPBCD x10).

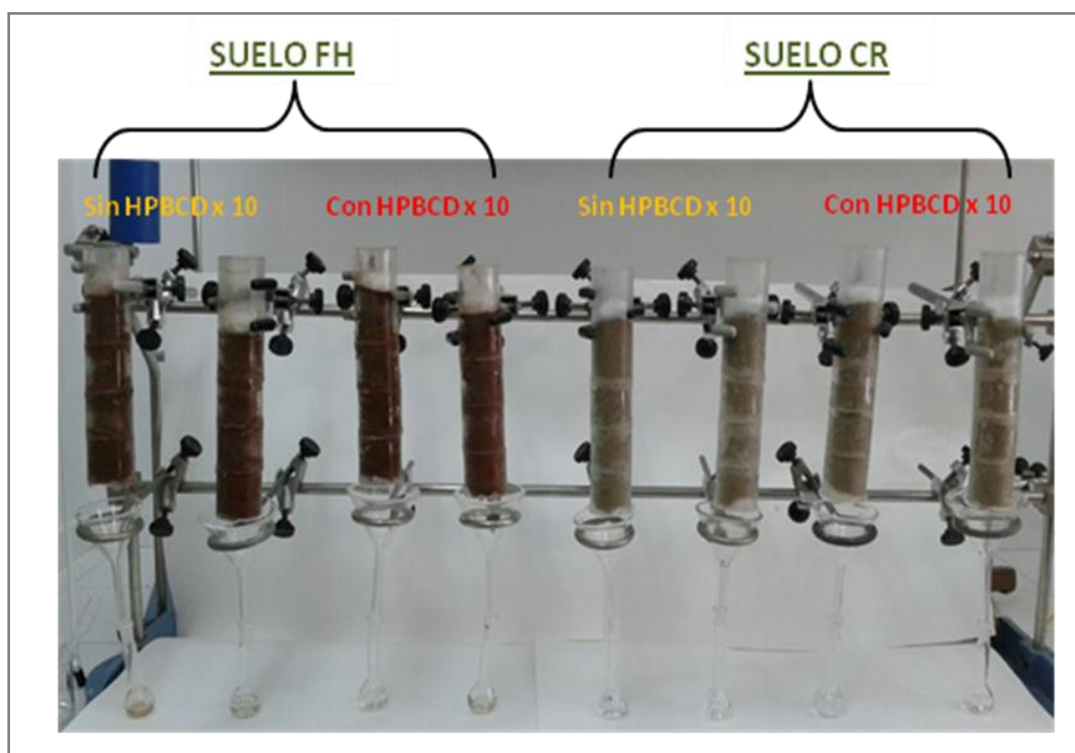


Figura 4.7. Columnas de los suelos FH y CR para el estudio de lixiviación de Diurón en presencia y ausencia de HPBCD.

Los resultados obtenidos a partir de la realización de estas experiencias en columnas de suelo han sido representados en forma de curvas de elución (Figura 4.8), donde en el eje de abscisas se representa el número de volúmenes de poro y en el de ordenadas la concentración relativa de Diurón eluido de la columna de suelo respecto a la inicialmente añadida (C/C_0). Los volúmenes de poro determinados para los distintos suelos empleados fueron 35 y 47 mL para los suelos FH y CR, respectivamente. La Figura 4.8 muestra las curvas de elución de Diurón, en presencia o en

ausencia de HPBCD x10, a través de los suelos FH y CR, empleando agua destilada como eluyente. Los parámetros calculados fueron: porcentaje (%) eluido, cantidad máxima de Diurón lixiviado ($C/C_{o_{max}}$), y número de volúmenes de poro al que se observó la mayor cantidad de Diurón lixiviado ($V_{p_{max}}$) (Langeron y col. 2014).

A partir de la curva de elución del herbicida donde no se aplicó HPBCD a través del suelo FH se determinó un porcentaje de elución del 6,65%. Sin embargo, para el suelo CR se observó una importante lixiviación llegándose hasta un 83,1%. Las $V_{p_{max}}$ se observaron después de aplicar 1,7 y 1,9 V_p para FH y CR, respectivamente. Para FH la $C/C_{o_{max}}$ fue 0,008 y para CR fue 0,14. El cálculo de estos parámetros sirvió para confirmar que el herbicida Diurón lixivió en mayor cantidad a través del suelo más arenoso, tal y como era de esperar, debido al bajo contenido en MO y a su alta porosidad (baja cantidad en fracción fina). Esta lixiviación se observó a lo largo de todo el tiempo del ensayo mostrando un pico de elución poco definido y muy ancho, lo que indica una cierta afinidad por este suelo, aunque de los suelos estudiados fue el que menor capacidad de adsorción mostró en las isothermas de adsorción-desorción (apartado 4.2). Langeron y col. (2014) también calcularon estos parámetros en sus estudios de columnas de suelo y estudiaron el comportamiento de 11 herbicidas de la familia de las fenilureas, Diurón entre otros, en un suelo con propiedades similares a FH con un alto contenido en MO (3,7%), donde observaron que el porcentaje eluido de Diurón fue de un 66%. Según estos autores, ese % eluido se debe a que ese suelo también presentaba un alto contenido en calcita (81,3%), lo que provocó un bloqueo en los puntos de adsorción de la MO. En nuestro caso esto no ocurrió porque el suelo FH sólo presenta un 1,60% de CO_3^{-2} . Kookana y col. (1995) llevaron a cabo estudios de percolación a través de columnas de suelo empleando un suelo arenoso (96% fracción arena) con 9 plaguicidas, obteniendo una mayor lixiviación para aquellos que mostraron un menor poder de adsorción, suponiendo estos resultados un potencial peligro de contaminación para aguas subterráneas en este tipo de suelos. Jhala y Singh (2012), también realizaron experimentos en columnas con un suelo arenoso para comparar la lixiviación de indaziflam, nuevo herbicida recientemente registrado para control de amplio espectro de malezas de cítricos, con 5 herbicidas comúnmente aplicados a suelos (uno de ellos Diurón). En los resultados obtenidos en el ranking de herbicidas de mayor a menor movilidad, Diurón fue el que presentó una menor movilidad. Navarro y col. (2012), estudiaron la lixiviación acumulativa de 12 herbicidas pertenecientes a la familia de las fenilureas en dos suelos con diferentes propiedades físico-químicas, especialmente en el contenido de MO (0,8-6,6%). Uno de los herbicidas estudiados fue Diurón, el cual presentó en el suelo con bajo contenido en MO (0,76%) casi un 40% de Diurón eluido y en el suelo con alto contenido en MO un 5%. Teniendo en cuenta tanto el contenido en MO como las propiedades

texturales de los suelos investigados en ambos trabajos las cantidades eluidas resultaron ser similares.

En las curvas de elución del herbicida Diurón obtenidas aplicando HPBCD x10, para estos mismos suelos, FH y CR, se determinó un porcentaje eluido de 7,71 y 73,2% respectivamente, es decir, al aplicar la HPBCD x10 no se observó una gran diferencia respecto a la lixiviación del herbicida, y los valores de $V_{p_{max}}$ y C/Co_{max} también fueron similares en los dos suelos respecto a los que no se añadió HPBCD x10. Esto indica que la HPBCD no provoca un aumento en la lixiviación del herbicida siendo esto un punto clave a tener en cuenta a la hora de emplearse las CDs en técnicas de descontaminación de suelos. El empleo de una concentración de CD 10 veces superior a la del herbicida presente en el suelo da lugar a una mayor biodisponibilidad del mismo, pero sin el problema de que provoque su lixiviación.

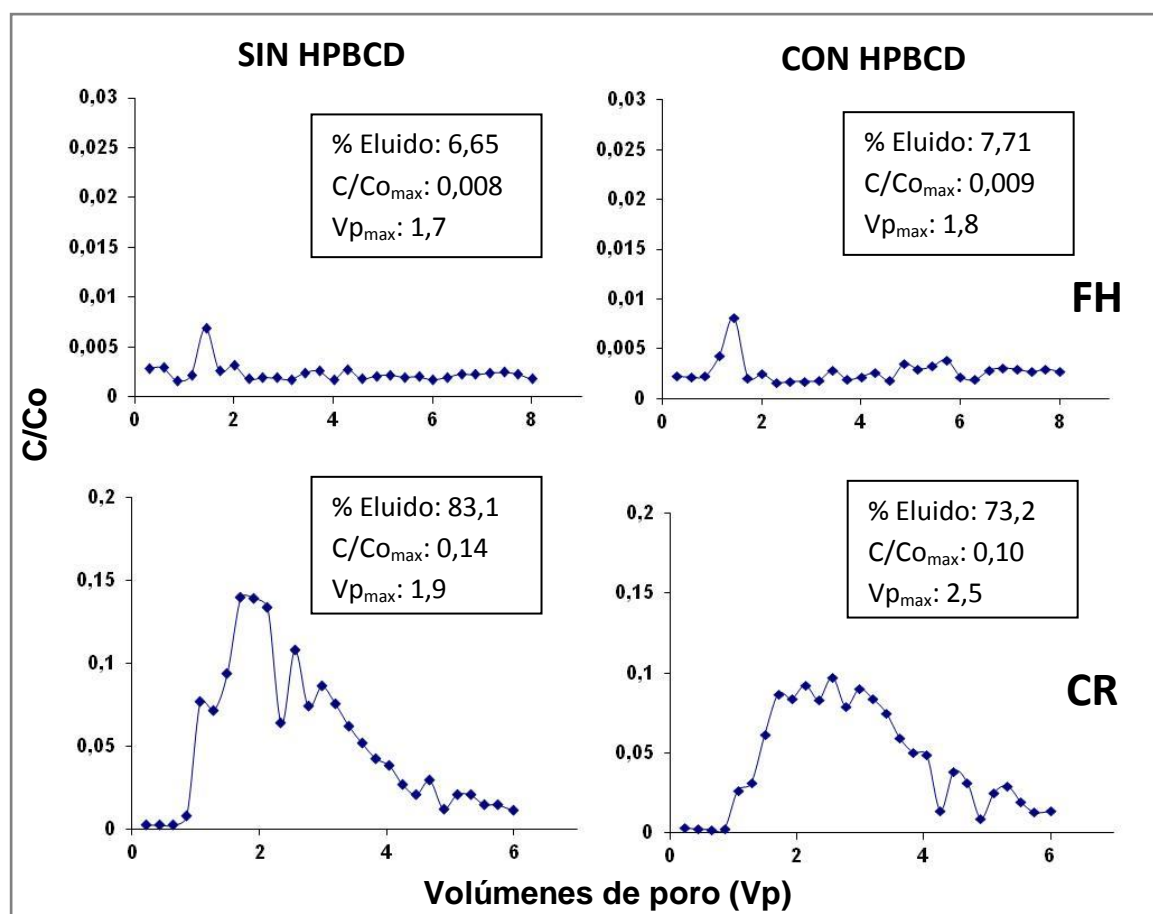


Figura 4.8. Curvas de elución de Diurón en los suelos FH y CR con y sin HPBCD, y agua destilada como eluyente.

La representación del porcentaje lixiviado acumulado de Diurón frente al número de volúmenes de poro da lugar a la obtención de las curvas de elución acumulativas del herbicida en las columnas de suelo, que se muestran en la Figura 4.9. Las curvas de elución acumulativa muestran

un comportamiento claramente diferenciado en cuanto al porcentaje eluido cuando el herbicida se aplica en los dos suelos estudiados. Sin embargo, al aplicar los dos tratamientos (con y sin HPBCD x10) en ambos suelos, se observa aún más claramente que no existe una gran diferencia al aplicar o no la HPBCD, no observándose un incremento en las tasas de lixiviación del herbicida.

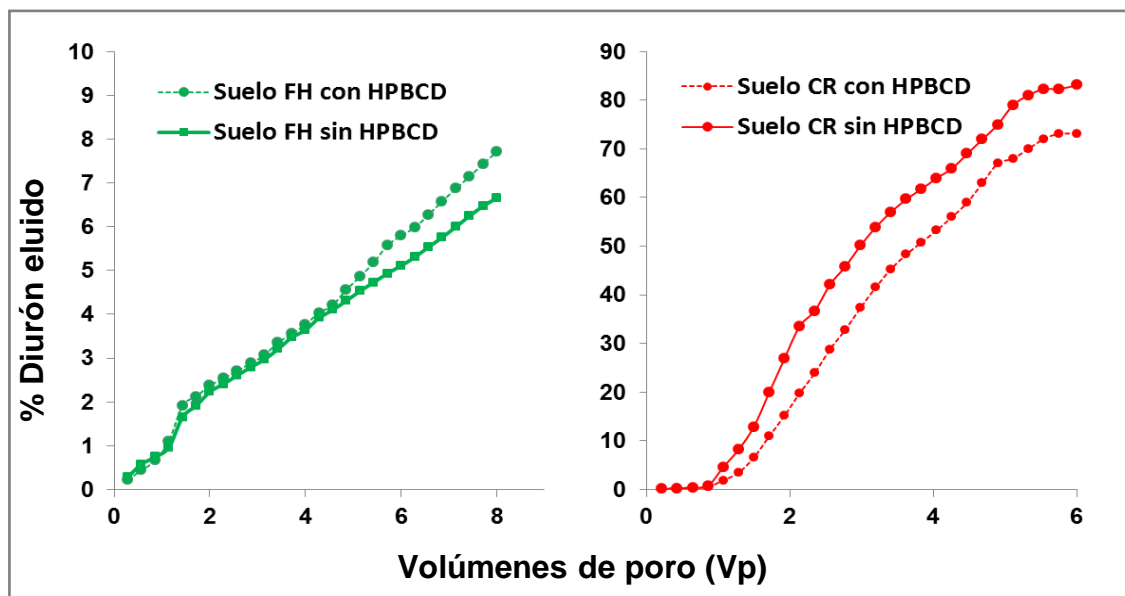


Figura 4.9. Curvas de elución acumulativa de Diurón en columnas de los suelos FH y CR.

La Tabla 4.9 muestra el porcentaje de Diurón eluido y también la distribución de las cantidades residuales de Diurón extraídas de cada anillo de las columnas de suelo después del lixiviado de las mismas, en función de la profundidad de la columna.

Tabla 4.9. Porcentaje de Diurón eluido y extraído de las columnas de suelo a distintas profundidades, en presencia o no de HPBCD x10.

	FH		CR	
PROFUNDIDAD (cm)	SIN HPBCD	CON HPBCD	SIN HPBCD	CON HPBCD
0-4	86,4 (± 0,6)	81,4 (± 0,8)	2,75 (± 0,01)	2,73 (± 0,05)
4-8	9,14 (± 1,84)	8,73 (± 0,01)	1,99 (± 0,04)	2,55 (± 0,02)
8-12	0,46 (± 0,01)	0,49 (± 0,02)	2,08 (± 0,06)	3,52 (± 0,01)
12-16	0,49 (± 0,02)	0,33 (± 0,01)	2,91 (± 0,03)	4,08 (± 0,03)
TOTAL EXTRAÍDO (%)	96,5 (± 0,6)	90,9 (± 0,2)	9,73 (± 0,04)	12,9 (± 0,1)
TOTAL ELUIDO (%)	6,65 (± 1,20)	7,71 (± 0,64)	83,1 (± 1,2)	73,2 (± 2,0)
TOTAL RECUPERADO (%)	103,2 (± 0,9)	98,7 (± 0,4)	92,8 (± 0,6)	86,1 (± 1,0)

En general, los residuos de Diurón extraídos de las columnas en el suelo CR mostraron una distribución homogénea, siendo algo superiores aquellos determinados en presencia de HPBCD x10 debido a su efecto de retención sobre el herbicida. También es destacable la distribución homogénea a lo largo de toda la columna de suelo de los residuos determinados. En cambio, para el suelo FH las cantidades más altas de Diurón residual fueron determinadas en los primeros anillos de la columna, siendo destacable también las cantidades recuperadas de los segundos anillos, indicando esto una alta retención del herbicida en presencia de HPBCD x10. El patrón de distribución de Diurón a lo largo de la columna de este suelo fue similar en ausencia y en presencia de HPBCD x10, al igual que ocurrió en el caso del suelo CR. La cantidad total recuperada en los suelos estudiados fue cercana a la inicialmente añadida con los dos tratamientos, sobre todo en el suelo FH. Esto nos lleva a pensar que no se ha sufrido pérdida alguna por degradación, algo que en un principio era de esperar, debido a que la vida media de Diurón es de 90 días a 1 año (Tomlin, 2000) y nuestras experiencias en columnas duraron 40 y 20 días para los suelos FH y CR, respectivamente.

En las isotermas de adsorción-desorción (apartado 4.2) HPBCD ha mostrado una capacidad tanto de aumentar la solubilidad de Diurón como de provocar la desorción del mismo, sin embargo en estos ensayos son destacables los resultados tan similares respecto al comportamiento que mostró Diurón en su lixiviación en presencia o no de HPBCD, especialmente en el caso del suelo CR, que en general ha mostrado una baja capacidad de retención mostrando una alta capacidad de lixiviación del herbicida.

Este comportamiento se ha observado en la adsorción de otros plaguicidas en suelos en presencia de distintos surfactantes (moléculas que contienen una parte hidrofílica y otra hidrofóbica al igual que las CDs), atribuyéndose el aumento en la adsorción de los plaguicidas a la previa adsorción de estas moléculas en el suelo (Krogh y col. 2001; Cserhati y col. 2002). Sánchez-Camazano y col. (2000) observaron que un surfactante adsorbido en el suelo podía aumentar la afinidad de atrazina por el mismo, mientras que el surfactante presente en solución aumentaría la afinidad del herbicida por la solución del suelo. Chapell y col. (2005) también observaron como la atrazina incluida en micelas de surfactantes permanecía más retenida en los suelos. La adsorción de contaminantes orgánicos fue mejorada aumentando el carácter hidrofóbico del suelo mediante el empleo de surfactantes (Sheng y col. 1998; Sánchez y col. 2003; Barhoumi y col. 2003). Thevenot y col. (2009) realizaron ensayos de lixiviación con Diurón en columnas con el fin de investigar las interacciones materia orgánica disuelta (MOD)-Diurón, y el posible co-transporte de Diurón y MOD utilizando 4 enmiendas orgánicas diferentes. Se observó un aumento en la lixiviación de Diurón sólo con dos enmiendas orgánicas, lo que sugirió un efecto

de MOD en el transporte de Diurón. Estas interacciones parecen estar relacionadas con el contenido de anillos aromáticos y alifáticos de MOD y la determinación de enlaces de hidrógeno y no covalentes.

Una vez comprobado que la presencia de HPBCD no provocaría un incremento en las cantidades lixiviadas ni en la tasa de lixiviación de Diurón, se procedió a estudiar si la presencia de la CD podría provocar un incremento en la tasa de degradación del herbicida a través de una mejora en la biodisponibilidad del mismo. Para ello, se realizó un estudio de biodegradación en los dos primeros anillos de las dos columnas del suelo FH, con y sin HPBCD x10, para observar si la cantidad de Diurón presente en esos segmentos consigue degradarse, en un tiempo determinado, por la propia flora endógena del suelo, y si la presencia de HPBCD residual mejora esa biodegradación. La degradación microbiana de herbicidas en suelos es el proceso fundamentalmente responsable de la disipación de éstos, es decir, es la principal ruta que lleva a la pérdida del plaguicida, y por lo tanto la que determina su persistencia en el sistema suelo-agua (Qureshi y col. 2008).

Para este experimento se empleó una solución de nutrientes (Tabla 2.5) con el objetivo de conseguir una bioactivación de la flora presente en el suelo FH. En la Figura 4.10 se muestran las curvas de biodegradación de Diurón con y sin HPBCD x10 a diferentes tiempos. Estas curvas de biodegradación fueron ajustadas y modelizadas usando las recomendaciones incluidas en la guía FOCUS (2006). Las dos curvas de mineralización se ajustaron al modelo de cinética de primer orden simple (SFO). Este modelo queda detallado en el apartado de Materiales y Métodos 3.2.7.

En general, en este estudio de biodegradación todos los parámetros obtenidos en los segmentos de la columna donde se adicionó HPBCD x10, los valores resultan ligeramente más favorables que sin el empleo de ésta. El porcentaje total biodegradado con HPBCD x10 después de 65 días de experimento fue de un 94% y sin HPBCD x10 fue del 87% biodegradado. En este suelo mientras se realizaron los ensayos de elución pasaron 40 días y no se observó ningún tipo de biodegradación ya que se recuperó el 100% de lo inicialmente añadido (Tabla 4.9). Esto lleva a pensar que en los 40 días en los que transcurrieron el experimento de elución, más los 65 días de este ensayo de biodegradación dónde se le añade una solución de nutrientes (SNs) (Tabla 2.5) se produce una activación de la flora endógena y se llega a alcanzar una completa biodegradación del herbicida. En realidad la cantidad de HPBCD que hay en el ensayo de biodegradación no se puede saber que exista 10 veces la cantidad del herbicida inicial, porque al ser una molécula con una alta solubilidad en agua, gran parte de la inicialmente añadida ha podido eluirse con facilidad. Aun así, los parámetros cinéticos de biodegradación fueron mejorados respecto a la no aplicación de

HPBCD Por eso, aunque el porcentaje biodegradado de Diurón sea diferente las constantes de biodegradación y las DT_{50} son similares (Figura 4.10).

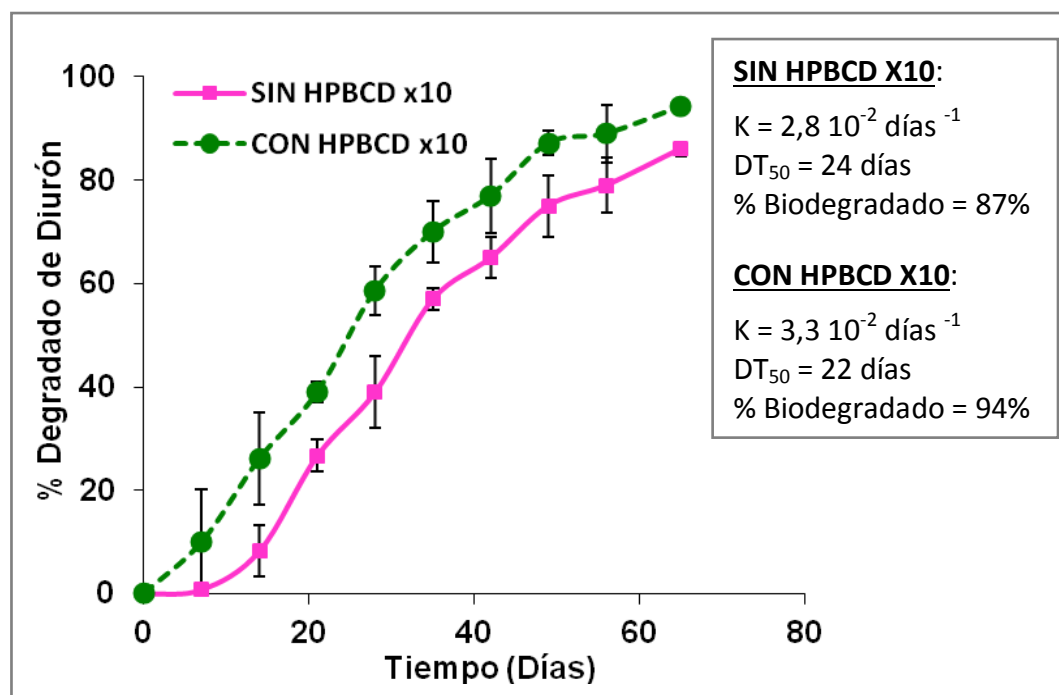


Figura 4.10. Curvas de biodegradación de Diurón en los dos primeros segmentos de las columnas del suelo FH, en presencia y no de HPBCD x10 a diferentes tiempos de envejecimiento.

De todo lo estudiado hasta ahora se puede concluir que la concentración de CD aplicada resultó no provocar un incremento en la capacidad de lixiviación de Diurón, pero sí, se consigue aumentar la biodisponibilidad del herbicida, provocando un incremento en la biodegradación del herbicida aunque no observándose grandes diferencias cuando no se usa HPBCD, porque como se ha mencionado anteriormente no se sabe a ciencia cierta qué cantidad de HPBCD está presente en el suelo. Estas diferencias sí se observarán en los siguientes resultados de atenuación natural asistida con el empleo de HPBCD x10, dónde se incrementará la tasa de mineralización y los parámetros cinéticos.

4.4. BIODegradación Y MINERALIZACIÓN DE DIURÓN EN SOLUCIÓN

Las estrategias de intervención para una exitosa biorrecuperación de aguas y suelos contaminados por compuestos persistentes se están orientando al uso de cepas microbianas específicas para un determinado contaminante (bioaumentación). Dado que la selectividad y especialización de los microorganismos añadidos es la clave para una efectiva biorrecuperación de los suelos, los estudios más recientes apuntan a la necesidad de usar consorcios bacterianos específicos para obtener un efectivo tratamiento biológico (Mikesková y col. 2012). Se trata de conseguir la eliminación completa del contaminante (mineralización).

4.4.1. Biodegradación de Diurón y formación de su metabolito 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA)

Los estudios de biodegradación de Diurón se llevaron a cabo en presencia de las tres cepas bacterianas degradadoras específicas (*Arthrobacter* sp. N2, *Variovorax* sp. SRS16 y *Advenella* sp. SLODRJ-01) descritas en el apartado 3.1.6 de Materiales y Métodos. Éstas fueron identificadas, tal y como se explica en el apartado 3.2.8.2 de Materiales y Métodos, en la base de datos de secuencia Genbank de NCBI y se obtuvo una similitud de 99,57% de *Arthrobacter* sp. N23 con *Arthrobacter sulfonivorans*, del 98,78% de *Variovorax* sp. SRS16 con *Variovorax soli* y del 99% de *Advenella* sp. SLODRJ-01 con *Advenella kashmirensis*.

El motivo por el cual se empleó *Advenella kashmirensis* en estos estudios de biodegradación fue porque ésta se aisló en nuestro laboratorio a partir de un suelo contaminado, el cual fue enriquecido con fenantreno, tal como se describe en Sopeña y col. (2013) y se quería comprobar si era capaz de degradar otros compuestos hidrofóbicos. Las cepas bacterianas *A. sulfonivorans* y *V. soli* ya han sido estudiadas por otros autores en la degradación de herbicidas. Villaverde y col. (2012) realizaron un estudio previo para detectar la presencia del herbicida Diurón y dicho metabolito (3,4-DCA) inoculado por *A. sulfonivorans* y *V. soli*. Widehem y col. (2001) observaron la degradación de Diurón en presencia de *Arthrobacter* sp. N2 transformándolo ésta a 3,4-DCA. Sorensen y col. (2008) aislaron la cepa bacteriana *V. soli* y realizaron un estudio de biodegradación del herbicida Diurón.

En el presente estudio de biodegradación se evaluó la capacidad de estas tres cepas bacterianas para degradar Diurón en medio líquido de manera aislada, formando parejas y las tres juntas en medio líquido, tal como se detalló en Materiales y Métodos (Tabla 2.7, Tratamientos del 1 al 7) con la intención de poder conseguir una biorrecuperación de aguas contaminadas por dicho herbicida. El objetivo de estos ensayos fue poder estimar en un periodo relativamente corto de tiempo cuáles de éstas eran capaces de utilizar Diurón como principal fuente de carbono y energía, y observar la presencia o no de uno de sus metabolitos principales, 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), la cual se considera un contaminante más recalcitrante y persistente a la biodegradación, presentando además una mayor toxicidad que la propia molécula del herbicida Diurón (Widehem y col. 2002).

Para poder utilizar los inóculos bacterianos en estos experimentos es necesario que éstos sean añadidos al sistema dentro de la fase estacionaria de su crecimiento. Por ese motivo se obtuvieron las curvas de crecimiento de las tres cepas bacterianas seleccionadas para ser utilizadas en los distintos experimentos de mineralización tal y como se describe en el apartado 3.2.6 del capítulo de Materiales y Métodos.

La Figura 4.11 muestra las curvas de crecimiento de *A. sulfonivorans*, *V. soli* y *A. kashmirensis* en las que se representan el logaritmo de la densidad óptica, medida a una longitud de onda de 600 nm, frente al tiempo. Estos experimentos se realizaron en medio R2A para *V. soli*, y en medio LB para las otras dos cepas, los cuales fueron suplementados con Diurón (40 mg L^{-1}), como se describe en el apartado 3.2.6 de Materiales y Métodos. En todos los casos se decidió que la toma de los cultivos para la preparación de los inóculos se llevara a cabo a las 21 horas de crecimiento (inicio de la fase estacionaria en los tres casos).

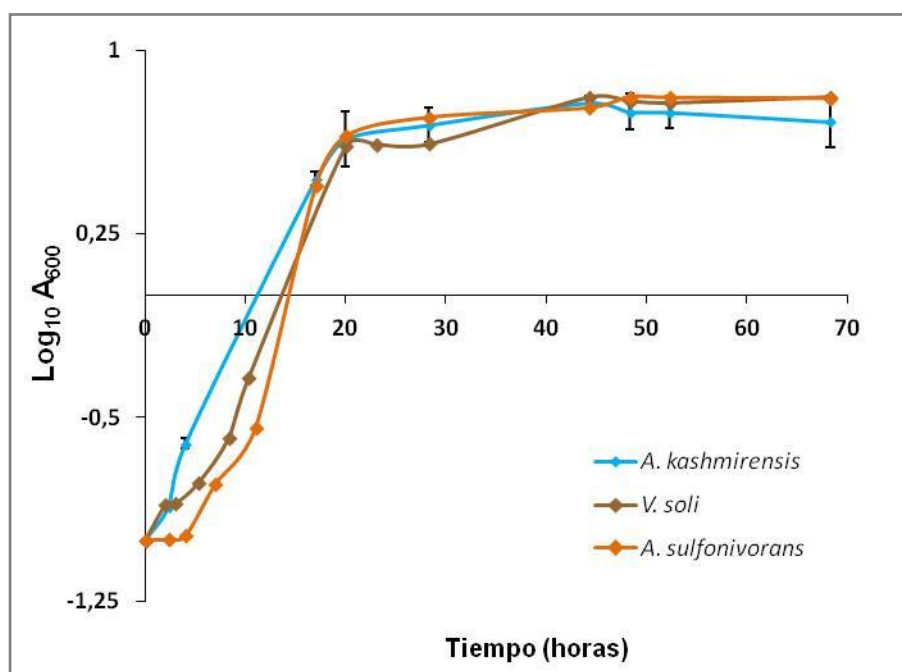


Figura 4.11. Curvas de crecimiento de las cepas *A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*.

En la Figura 4.12 se muestran las curvas de degradación de Diurón en presencia de *A. sulfonivorans* (1), *V. soli* (2), *A. kashmirensis* (3). En cada una de ellas se representa el porcentaje de Diurón no degradado residual en el medio frente al tiempo del ensayo. En la Tabla 4.10, se muestran los parámetros cinéticos a partir de las curvas de biodegradación de las cepas bacterianas por separado, formando parejas y formando un consorcio bacteriano de tres, los cuales fueron ajustados y modelizados usando la guía FOCUS (2006), usando el modelo de mínimos cuadrados incluido en el paquete estadístico de Microsoft Excel, Solver (apartado 3.2.4, sección Materiales y Métodos). Todas las biodegradaciones se ajustaron a una cinética de primer orden (bifásica Hockey-Stick, HS), excepto la cepa *V. soli* (2) la cual se ajustó mejor a una cinética de primer orden (SFO).

Tabla 4.10. Parámetros cinéticos a partir de las curvas de biodegradación de Diurón en solución, tras la inoculación con *A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*.

Cepas bacterianas	Modelo cinético	K ₁ (día ⁻¹)	K ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de biodegradación (%)
<i>A. sulfonivorans</i>	HS	1,7 10 ⁻¹	3,0 10 ⁻³	3,5	38,0	48,3
<i>V. soli</i>	SFO	6,6 10 ⁻³	-	-	105	17,5
<i>A. kashmirensis</i>	HS	8,9 10 ⁻²	6,9 10 ⁻⁴	4,2	731	25,2
<i>A. sulfonivorans</i> + <i>V. soli</i>	HS	2,2 10 ⁻¹	5,3 10 ⁻³	3,5	3,1	58,0
<i>A. kashmirensis</i> + <i>A. sulfonivorans</i>	HS	3,7 10 ⁻¹	1,3 10 ⁻²	2,5	1,9	68,0
<i>A. kashmirensis</i> + <i>V. soli</i>	HS	9,4 10 ⁻¹	5,1 10 ⁻³	3,3	75,8	41,2
<i>A. sulfonivorans</i> + <i>A. kashmirensis</i> + <i>V. soli</i>	HS	2,8 10 ⁻¹	1,5 10 ⁻²	4,4	2,5	79,0

SFO: modelo cinético de primer orden simple; HS: modelo cinético de primer orden bifásico (Hockey-Stick).

k₁: constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k₂: constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

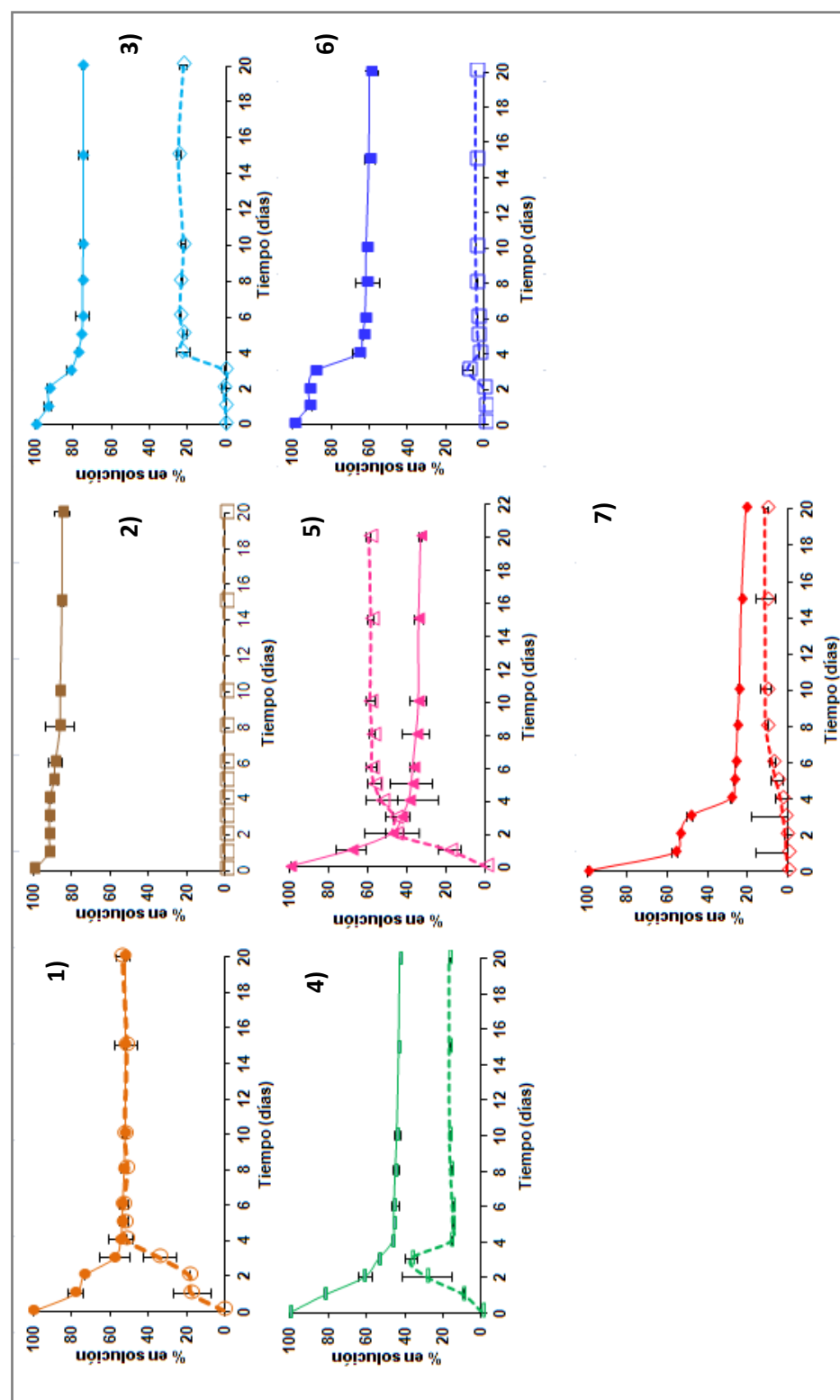
DT₅₀: Tiempo necesario para alcanzar el 50% mineralizado (días).

Tal como se observa en la Figura 4.12 y en la Tabla 4.10, las tres cepas aisladas (1, 2 y 3) presentan diferencias. En el caso de *A. sulfonivorans* (1) se consiguió una degradación de un 48,3% de la cantidad de Diurón inicial en 20 días, mientras que en el caso de *V. soli* (2) fue del 17,5% y con *A. kashmirensis* (3) se observó como a tiempo final del ensayo el porcentaje de Diurón degradado fue del 25,2%.

En general, es difícil encontrar degradadores específicos descritos de Diurón en la literatura. Turnbull y col. (2001b) observaron resultados de degradación de Diurón en presencia de *Arthrobacter globiformis* D47 la cual degradaba en 4 días casi el 90% de la concentración de Diurón inicial. Sorensen y col. (2008) realizaron estudios de biodegradación con la cepa bacteriana *V. soli* y no obtuvieron ningún dato significativo, pero sí observaron degradación con otro degradador específico (*Sphingomonas* sp. SRS2) (Sorensen y col. 2013), que lo degradó en 10 días dando lugar a diferentes metabolitos además de 3,4-DCA, como son DCPMU y DCPU.

Cuando se realiza la biodegradación de Diurón usando cepas por parejas (*A. sulfonivorans* y *V. soli* (4), *A. sulfonivorans* y *A. kashmirensis* (5) y *A. kashmirensis* y *V. soli* (6)) se consigue mayor

Figura 4.12. Curvas de biodegradación de Diurón en solución (línea continua) y formación del principal metabolito 3,4-DCA (línea discontinua) en presencia de diferentes cepas bacterianas. Inoculación de cepas bacterianas individuales: *A. sulfonivorans* (1), *V. soli* (2), *A. kashmirensis* (3); inoculación por parejas bacterianas: *A. sulfonivorans* + *V. soli* (4), *A. kashmirensis* + *A. sulfonivorans* (5), *A. kashmirensis* + *V. soli* (6); inoculación del consorcio bacteriano *A. sulfonivorans* + *A. kashmirensis* + *V. soli* (7).



porcentaje de degradación cuando una de las dos cepas en la pareja es *A. sulfonivorans* (4, 5) siendo el porcentaje degradado 58,0% cuando son *A. sulfonivorans* y *V. soli* (4) y un 68,0% degradado cuando se utilizó conjuntamente *A. kashmirensis* y *A. sulfonivorans* (5). *A. kashmirensis* y *V. soli* (6) sólo fueron capaces de degradar un 41,2%. Ngigi y col. (2011), combinaron dos cepas bacterianas, *V. fluvialis* y *B. ambifaria*, en medio MSM, las cuales fueron capaces de biodegradar un 30% de la concentración inicial de Diurón aplicada (40 mg L⁻¹) en aproximadamente 41 días.

Al emplear las 3 cepas bacterianas formando un consorcio bacteriano el porcentaje de Diurón degradado alcanzó el máximo, un 79,0% con respecto a la concentración inicial. Numerosos consorcios han sido usados para la biodegradación de diferentes contaminantes orgánicos obteniendo mejores resultados que mediante la adición de cepas de microorganismos aislados (Hudcova y col. 2011; Pino y Penuela 2011; Ngigi y col. 2011; Mikesková y col. 2012), poniendo especial atención en el desarrollo y optimización de los consorcios bacterianos para que puedan sobrevivir y que sean biológicamente activos cuando se inoculan en suelos y tienen que competir con la flora endógena.

En la Figura 4.12 también se muestran los porcentajes residuales del principal metabolito (3,4-DCA) generado en el proceso de biodegradación, obtenido dicho porcentaje en solución con respecto al teórico (100% de Diurón degradado). En el estudio de las tres cepas por separado, existen diferencias entre cada una de ellas en el porcentaje del metabolito obtenido. Cuando se inocula *A. sulfonivorans* (1) se obtiene un porcentaje de metabolito prácticamente igual al porcentaje del herbicida degradado, es decir, parece que esta bacteria convierte el herbicida Diurón directamente a 3,4-DCA. En la mayoría de artículos publicados sobre la degradación de Diurón se observa la acumulación de 3,4-DCA como resultado final de la misma (Ellis y Camper, 1982; Tixier y col. 2000, 2001, 2002; Sorensen y col. 2003; Giacomazzi y col. 2004). Turnbull y col. (2001a, b) confirman la vía de degradación propuesta por Cullington y Walker (1999), determinando que *A. globiformis* D47 degrada el 87% de la concentración inicial de Diurón a 3,4-DCA. La degradación en medio líquido por *Arthrobacter* sp. N2 también determinó la presencia del metabolito 3,4-DCA (Widehem y col. 2002).

El porcentaje residual que se obtiene de 3,4-DCA para *V. soli* (2) es prácticamente nulo, y para *A. kashmirensis* (3) fue de un 22,5%. *V. soli* (2), no fue capaz de degradar el herbicida Diurón, por tanto no se pudo determinar metabolito. En el caso de *A. kashmirensis* (3), degrada Diurón pero en menor porcentaje que lo hace *A. sulfonivorans* (1), y todo lo que se degrada se convierte en este metabolito.

El metabolito 3,4-DCA obtenido al inocular por pareja *A. sulfonivorans* y *V. soli* (4), *A. sulfonivorans* y *A. kashmirensis* (5) y *A. kashmirensis* y *V. soli* (6) fue del 16,9, 60,0% y 4,38%, respectivamente. Al inocular *A. sulfonivorans* y *A. kashmirensis* (5) en pareja el porcentaje de metabolito detectado coincide con la suma de la aportación de 3,4-DCA de cada una de las cepas por separado, indicando esto que ambas son capaces de degradar Diurón, pero que ninguna de ellas es capaz de eliminar este metabolito altamente tóxico. En cambio, en los otros dos tratamientos en donde está presente *V. soli* (*A. sulfonivorans* y *V. soli* (4), y *A. kashmirensis* y *V. soli* (6)), el porcentaje de 3,4-DCA es menor que cuando actúan *A. sulfonivorans* y *A. kashmirensis* por separado, pudiéndose concluir que *V. soli* es capaz de degradar 3,4-DCA. Según Sorensen y col. (2008) *Variovorax* SRS16 es la primera cepa bacteriana capaz de conseguir mineralizar Diurón aunque existen estudios previos (Dejonghe y col. 2002) que describen la capacidad que presenta la cepa *Variovorax* sp. para conseguir la completa mineralización del herbicida linurón. Este herbicida pertenece a la misma familia que Diurón, y su metabolito principal es también 3,4-DCA. En ambos casos se confirman como cepas pertenecientes al género *Variovorax* y en presencia de nutrientes, fueron capaces de conseguir una completa mineralización de estos herbicidas.

Con el empleo del consorcio formado por las tres cepas bacterianas el porcentaje de 3,4-DCA en solución al final del experimento de biodegradación fue del 11,3%, significando esto que al adicionar los inóculos de las tres cepas bacterianas se degrada tanto el Diurón como el metabolito 3,4-DCA. En conclusión, nuestros resultados de degradación del herbicida Diurón mediante el empleo de un triple consorcio bacteriano dan lugar a mejores porcentajes de degradación con respecto a la adición de las cepas bacterianas de forma separada. Según la literatura estos resultados corroboran que las rutas de degradación con consorcios bacterianos dan mejores resultados que cepas bacterianas inoculadas de forma individual, presentando mejores ventajas por la diversidad metabólica presente en el sistema, siendo necesaria para la descontaminación en suelos (Rahman y col. 2002a, b; Nyer y col. 2002).

4.4.2. Mineralización de Diurón con cepas bacterianas degradadoras específicas

Se realizaron experiencias para comprobar que las cepas seleccionadas, bien por separado, en parejas o formando un consorcio, eran capaces no sólo de degradar Diurón en solución sino de mineralizarlo. Los inóculos fueron añadidos al sistema dentro de su fase estacionaria de crecimiento (21 días) (Figura 4.11).

La Figura 4.13 muestra las curvas de mineralización de Diurón, en medio MSM suplementado con 10 mg L⁻¹ de Diurón, 450 Bq de Diurón y 1 mL de SNs tal como se describe en el apartado 3.2.7 de Materiales y Métodos.

Las mineralizaciones se hicieron igual que las biodegradaciones comentadas en el apartado anterior (4.1.2) con las cepas bacterianas por separado, formando pareja y, las 3 cepas bacterianas formando un consorcio. Los diferentes tratamientos estudiados en estos ensayos se recopilan en la Tabla 2.8 (Tratamiento del 8 al 14) en la sección de Métodos.

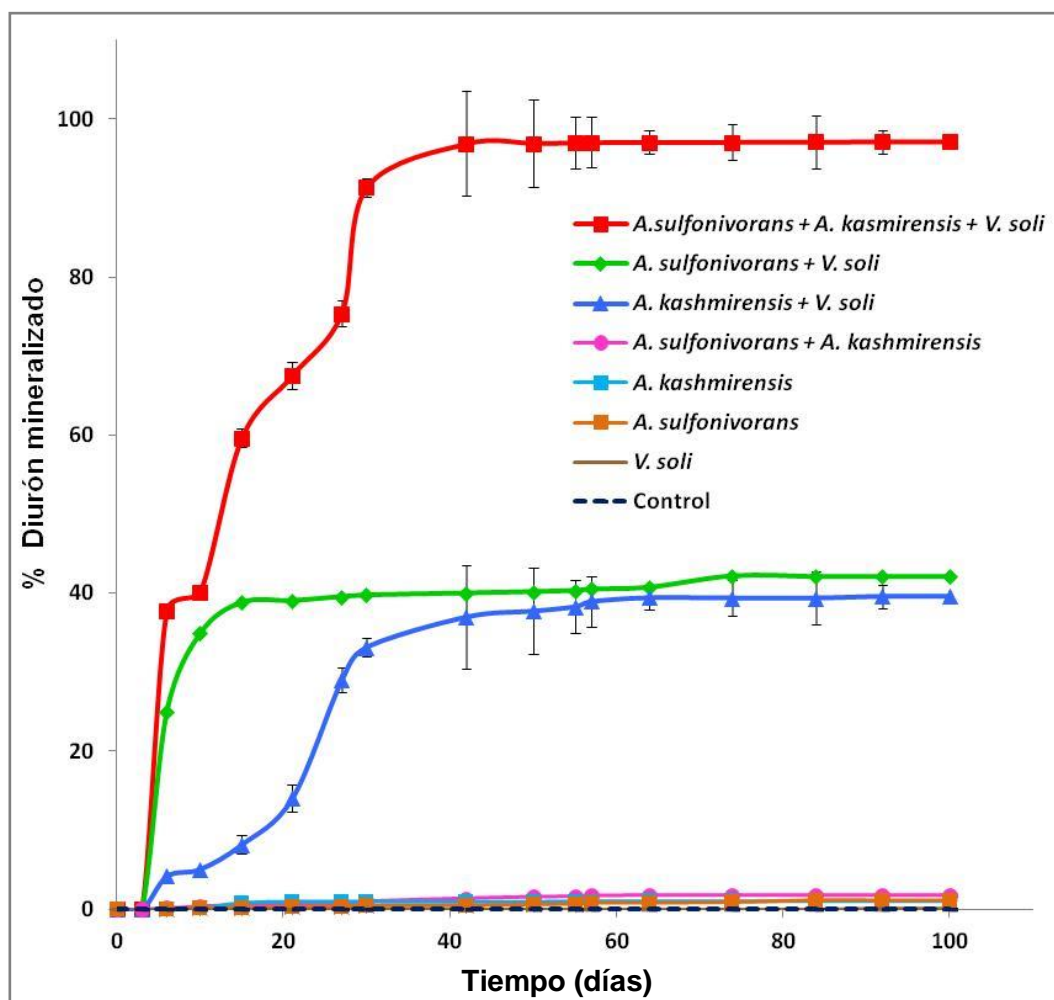


Figura 4.13. Curvas de mineralización de Diurón en medio MSM inoculado con las cepas bacterianas *A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*.

En las curvas de mineralización obtenidas con las cepas bacterianas por separado no se observó aumento alguno del porcentaje de Diurón mineralizado a lo largo de todo el ensayo, al igual que en un ensayo control (ninguna cepa bacteriana inoculada) que también se realizó (Figura 4.13). Es decir, las cepas bacterianas por separado no fueron capaces por sí solas de mineralizar Diurón. En los casos donde las cepas bacterianas se inocularon por pareja o formando un consorcio, siguieron un modelo estándar de curva de mineralización con tres estados o fases diferenciadas. En primer lugar la denominada fase lag (o fase de aclimatación), en la que los microorganismos inoculados en el medio se adaptan a la presencia del Diurón que se ha adicionado. La fase lag se prolonga hasta que el porcentaje mineralizado es > 5%. A continuación hay un incremento en la

tasa de mineralización, representada por la fase exponencial de la curva, y después la actividad catabólica alcanza un *plateau* que suele deberse a una falta de nutrientes o a los efectos tóxicos tanto del compuesto como de sus metabolitos presentes en solución (Alexander 2001), que como ya se ha comentado podrían llegar a ser más tóxicos que el propio compuesto original, como en el caso del herbicida estudiado.

En la Tabla 4.11, se muestran los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las curvas de mineralización de Diurón de las cepas bacterianas por separadas, formando parejas y formando un consorcio bacteriano, las cuales fueron ajustadas y modelizadas siguiendo las recomendaciones del grupo de trabajo FOCUS (2006). Todas las curvas de mineralización en presencia de las cepas inoculadas por separado y la pareja formada por *A. sulfonivorans* - *A. kashmirensis* se ajustaron a una cinética simple de primer orden (SFO). Las otras dos parejas, *A. sulfonivorans* - *V. soli* y *A. kashmirensis* - *V. soli* y el consorcio formado por las tres cepas bacterianas se ajustaron mejor a una cinética de primer orden bifásica Hockey-Stick (HS). El tiempo de aclimatación (fase lag) se calculó siguiendo las recomendaciones de la guía FOCUS (2006), es decir, a partir del modelo HS modificado y/o invertido, (MHS).

Tabla 4.11. Parámetros cinéticos a partir de las curvas de mineralización de Diurón en solución tras la inoculación de *A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*.

Cepas bacterianas	Modelo cinético	K ₁ (día ⁻¹)	K ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
<i>A. sulfonivorans</i>	SFO	1,0 10 ⁻⁴	-	-	416	5682	1,24
<i>A. kashmirensis</i>	SFO	1,0 10 ⁻⁴	-	-	500	7122	1,34
<i>V. soli</i>	SFO	3,6 10 ⁻⁶	-	-	1388	190322	0,05
<i>A. sulfonivorans</i> + <i>A. kashmirensis</i>	SFO	2,0 10 ⁻⁴	-	-	250	3527	0,98
<i>A. sulfonivorans</i> + <i>V. soli</i>	HS	6,4 10 ⁻²	7,1 10 ⁻⁴	10,2	2,0	334,8	42,5
<i>A. kashmirensis</i> + <i>V. soli</i>	HS	1,4 10 ⁻²	7,0 10 ⁻⁴	36,7	2,2	375,6	40,1
<i>A. sulfonivorans</i> + <i>A. kashmirensis</i> + <i>V. soli</i>	HS	6,2 10 ⁻²	2,3 10 ⁻¹	26,5	1,9	13,5	99,8

SFO: modelo cinético simple de primer orden; HS: modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick.

k₁: constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k₂: constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: Tiempo necesario para alcanzar el 50% mineralizado (días).

Los parámetros incluidos en la Tabla 4.11 son: fase lag, extensión global de la mineralización (%), k_1 , k_2 , t_b y DT_{50} , siendo k_1 la constante de velocidad en la fase exponencial y k_2 la constante de velocidad en la fase estacionaria de mineralización. La k_2 sólo fue calculada cuando se ajustó a una cinética de HS. Además, cuando la cinética es HS, se calcularon los t_b o, puntos de rupturas, es decir, tiempo de mineralización a partir del cual la tasa de mineralización es k_2 (fase estacionaria). También aparecen las DT_{50} , un parámetro empleado para estimar la persistencia del herbicida en el medio ambiente, siendo el tiempo que tarda el herbicida en ser degradado un 50%.

Cuando las cepas bacterianas fueron inoculadas por separado prácticamente no se detectó mineralización (los valores de mineralización estuvieron por debajo del 5%). Las dos cepas inoculadas en el ensayo *A. sulfonivorans* - *A. kashmirensis* tampoco presentaron un dato significativo de mineralización (0,98%). En cambio las otras dos parejas (*A. sulfonivorans* - *V. soli* y *A. kashmirensis*-*V. soli*) fueron capaces de mineralizar Diurón de una manera significativa, aunque con ciertas diferencias entre cada una de ellas. La duración de la fase lag para *A. sulfonivorans* - *V. soli* y *A. kashmirensis* -*V. soli* fue sólo de 2 y 2,2 días, respectivamente, lo que indica que ambas parejas consiguieron adaptarse rápidamente a la presencia del herbicida en el medio como única fuente de carbono, comenzando rápidamente la mineralización. Sorensen y col. (2008) describieron también una ruta de mineralización empleando sólo dos cepas bacterianas formando un consorcio (*Arthrobacter globiformis* D47 y *Variovorax* sp. SRS16) en un estudio de mineralización de linurón y Diurón obteniendo una mineralización del $61,8\% \pm 1,0\%$.

Cuando se inoculan las tres cepas bacterianas todos los parámetros cinéticos fueron mejorados con respecto a las otras inoculaciones investigadas, es decir, la mineralización tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria ocurre más rápidamente ($k_1 = 6,2 \cdot 10^{-2}$; $k_2 = 2,3 \cdot 10^{-1}$), además de acortarse la fase lag (1,9 días) y la DT_{50} se alcanzó sólo en 13,5 días, siendo especialmente destacable la extensión global de mineralización que fue del 99,8%. A partir de estos resultados se puede concluir que la aplicación conjunta de las tres cepas investigadas forman un consorcio extraordinario, ya que se acortan los tiempos de mineralización y, además se consigue eliminar de manera completa el riesgo tóxico derivado, tanto del herbicida como de sus metabolitos, evitando así la producción de compuestos intermedios que sean relativamente persistentes y que pudieran resultar ser aun más contaminantes que la propia molécula de Diurón.

En base a los resultados de mineralización obtenidos, para la realización de los posteriores estudios de mineralización se optó por usar las tres bacterias como un consorcio, por ser, de

todas las posibilidades ensayadas, la que se adapta con más rapidez a la presencia de Diurón en el sistema y, como se ha observado, produce mejores tasas de mineralización.

En un estudio paralelo a las mineralizaciones se determinó el porcentaje de bacterias vivas y muertas a lo largo del experimento de mineralización en solución en los que se emplearon las tres cepas bacterianas usando un Kit de tinción L7007 (apartado 3.2.7.1 de Materiales y Métodos) mediante microscopía de epifluorescencia, dónde se pudieron distinguir células muertas (rojas) de vivas (verdes). El objetivo de este ensayo fue monitorizar la supervivencia de las cepas bacterianas que componen el consorcio degradador específico durante el tiempo de ensayo y así correlacionar dichos resultados con la capacidad de mineralización de dicho consorcio. En la Tabla 4.12 se representa el porcentaje de células muertas observado visualmente en el microscopio de epifluorescencia a diferentes tiempos del ensayo hasta 50 días, tiempo al cual la mineralización alcanza el 100%. Igualmente, en la Tabla 4.12 se muestran los porcentajes correspondiente al estudio control el cual sólo contenía las cepas bacterianas sin el herbicida. En la Figura 4.14 se observan las bacterias vivas y muertas después de 50 días.

Tabla 4.12. Porcentaje del consorcio bacteriano no viable observado en el microscopio de epifluorescencia y el número de células totales a diferentes tiempos.

Tiempo (días)	Consortio bacteriano		Consortio bacteriano + Diurón	
	Células totales	(%)	Células totales	(%)
0	91	21,4	94	5,85
3	97	23,2	107	12,6
10	114	29,8	162	15,2
20	130	35,4	205	18,4
35	141	42,6	233	22,7
50	161	71,4	255	30,6

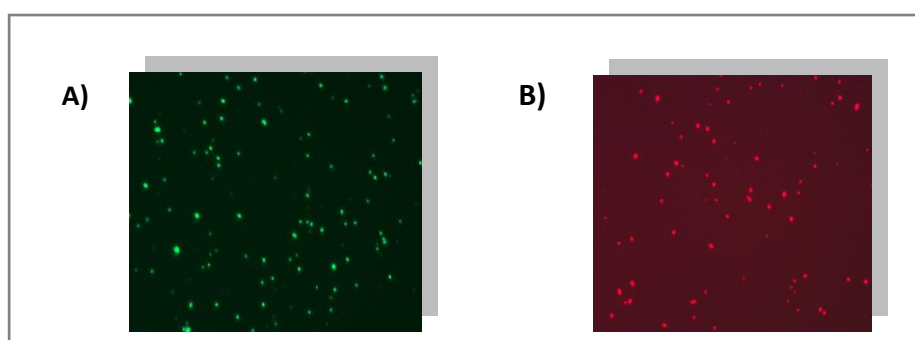


Figura 4.14. Fotos del consorcio degradador de Diurón obtenidas por microscopía de epifluorescencia. **A)** Bacterias vivas, **B)** Bacterias muertas.

Tras 50 días de mineralización, en el estudio control, un 71,4% de las cepas bacterianas habían muerto, en cambio en el ensayo en presencia del herbicida a 10 mg L^{-1} sólo se observó un 30,6% de células no viables (rojas), es decir, un 69,4% de las células degradadoras de Diurón permanecieron viables para llevar a cabo la mineralización del herbicida, algo que se constata en el apartado anterior (4.4.2).

Por tanto, se puede concluir que este consorcio bacteriano sigue permaneciendo activo aunque un 30,6% dejasen de ser viables, existiendo además mayor número de células totales en presencia de Diurón (Tabla 4.12). Otra importante conclusión es la capacidad de este consorcio bacteriano de usar Diurón como única fuente de carbono para el desarrollo de su actividad metabólica y reproducción, tal y como se demuestra al observar la tasa de supervivencia sin presencia del herbicida (experimento control) donde después de 50 días de ensayo el porcentaje de células no viables fue del 71,4%.

A modo esquema, a partir de los resultados obtenidos hasta ahora y de la literatura científica consultada, en la Figura 4.15 queda reflejada la hipótesis de partida para la mineralización de Diurón en presencia del consorcio bacteriano estudiado.

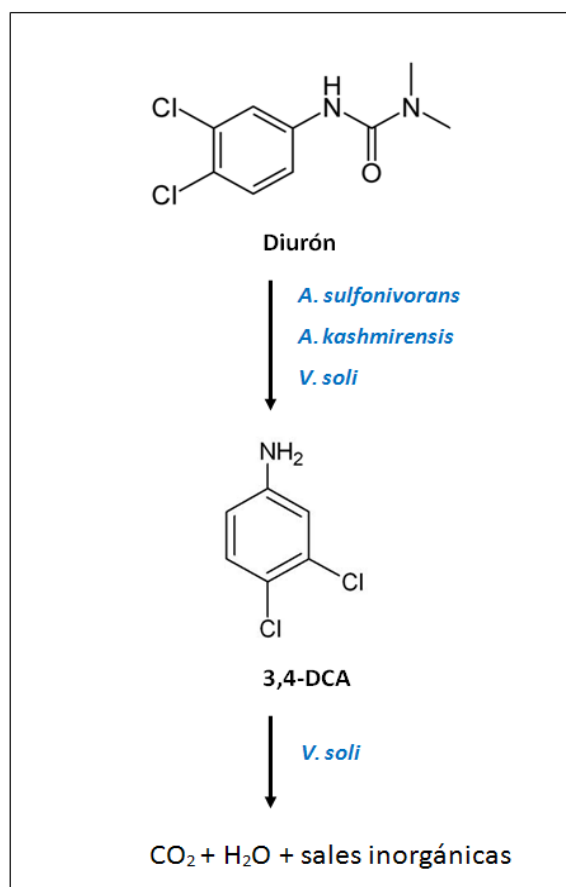


Figura 4.15. Vía de biodegradación y/o mineralización de Diurón mediante las 3 cepas bacterianas degradadoras específicas estudiadas.

El hecho de la alta efectividad que presenta este consorcio bacteriano por conseguir la completa eliminación del herbicida Diurón en medio líquido nos lleva a plantear un estudio en profundidad de las rutas metabólicas que siguen estas cepas bacterianas así como las enzimas implicadas, a través de la identificación de los genes que codifican a dichas enzimas en sus genomas.

4.4.3. Caracterización molecular de las cepas bacterianas degradadoras específicas

Con el objetivo de confirmar la hipótesis propuesta de biodegradación y/o mineralización de Diurón (Figura 4.15) se llevó a cabo un estudio a nivel genético para detectar en *A. sulfonivorans*, *V. soli* y *A. kashmirensis* los genes que codifican las enzimas específicas degradadoras de Diurón en su ruta metabólica. Este ensayo fue basado en gran parte, en el estudio de Bers y col. (2011) donde logran describir una ruta catabólica para biodegradar linurón, un herbicida perteneciente a la familia de las fenilureas, en presencia de la cepa bacteriana *Variovorax* sp. SRS16. Además, Dejonghe y col. (2003) y Breugelmans y col. (2010) indican que *Variovorax* sp. strain WDL1 degrada linurón porque es capaz de convertirlo en DCA mediante una enzima dioxigenasa. Otros autores afirman que la mayoría de las bacterias capaces de degradar a los herbicidas de la familia de las fenilureas poseen la enzima que codifican los genes Puh A y Puh B (Khurana y col. 2009; Pesce y col. 2012).

La presencia de genes específicos para la degradación de Diurón que codifican las diferentes enzimas descritas en la literatura y que intervienen en la mineralización de distintas fenilureas, fueron detalladas a partir del análisis del genoma de cada una de las cepas estudiadas en la presente memoria utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tal y como se explica en el apartado 3.2.8.4 de Materiales y Métodos. Los genes catabólicos específicos analizados (Lib A, dcaQ y ccdC) para las tres cepas bacterianas se muestran en la Tabla 4.13.

De las tres cepas bacterianas la única donde se apreció una banda en el gel de agarosa para el gen Puh A es *A. sulfonivorans*, confirmándose su potencial capacidad para catalizar la conversión de Diurón a su principal metabolito 3,4-DCA. Turnbull y col. (2001a, b) y Khurana y col. (2009), fueron los que describieron los genes Puh A y Puh B para *Arthrobacter globiformis* D47 y *Mycobacterium brisbanense* JK1. El gen Puh B no se observó en la especie de género *Arthrobacter* que se usa en este trabajo (*Arthrobacter sulfonivorans*), ni en las otras dos cepas bacterianas (Tabla 4.13). En cambio, en las cepas *A. kashmirensis* y *V. soli* se detectó una banda correspondiente al gen Lib A. Esto quiere decir que las tres cepas bacterianas serían capaces de degradar Diurón por medio de la hidrólisis de la molécula convirtiéndola en 3,4-DCA pero usando diferentes enzimas. En el estudio de Bers y col. (2011) se demuestra que el gen Lib A es específico de *Variovorax* sp. SRS16, la cual gracias a este gen es capaz de degradar linurón. Existen estudios

que describen genes de *A. kashmirensis*, como son el A8, Bb, Tk y Te (Ghosh y col. 2013) pero no existen estudios que corroboren que *A. kashmirensis* posee el gen Lib A.

Tabla 4.13. Genes específicos degradadores de Diurón analizados en PCR para las 3 cepas bacterianas (*A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*).

Genes	Función	Resultados PCR		
		<i>A. sulfonivorans</i>	<i>V. soli</i>	<i>A. kashmirensis</i>
Puh A⁽¹⁾	Fenilurea hidrolasa	+	-	-
Puh B⁽¹⁾	Fenilurea hidrolasa	-	-	-
Lib A⁽²⁾	Linuron hidrolasa	-	+	+
dcaQ⁽²⁾	Glutamina sintetasa y transposasa	+	+	+
ccdC⁽²⁾	Clorocatecol dioxigenasa	-	+	-

Banda en el gel de agarosa (+); Sin banda en el gel de agarosa (-).

⁽¹⁾Pesce y col. (2012).

⁽²⁾Bers y col. (2011).

El gen *dcaQ* es un gen específico de las tres cepas bacterianas (Tabla 4.13). Este gen, codifica la enzima glutamina sintetasa y transposasa. Las tres cepas bacterianas degradan 3,4-DCA a un supuesto metabolito [4,5-diclocatecol]. Por último, el gen *ccdC* es específico de *V. soli*, el cual es capaz de romper el anillo aromático. Esta estructura química es más compleja de eliminar que todas las anteriormente mencionadas, llegando a obtener intermediarios del ciclo de Krebs y, finalmente, CO₂ (Bers y col. 2011).

Con el estudio de los genes específicos para degradar Diurón y con la hipótesis de partida (Figura 4.15) para la mineralización de éste herbicida, en la Figura 4.16 se observa la ruta catabólica propuesta para la biodegradación de Diurón en presencia de las cepas bacterianas. Esta empieza con la hidrólisis del grupo amida del Diurón dando lugar a dimetilamina y 3,4-DCA por los genes Lib A (en *V. soli* y *A. kashmirensis*) y Puh A (*A. sulfonivorans*) que codifican a las enzimas linurón hidrolasa y fenilurea hidrolasa, respectivamente. La dimetilamina no es recalcitrante y se degrada fácilmente hasta CO₂ y H₂O. En cambio, 3,4-DCA, al ser un metabolito muy perjudicial y difícil de eliminar del medio ambiente, más incluso que la propia molécula del herbicida Diurón (Widehem y col. 2002), debe transformarse en diferentes metabolitos menos tóxicos para obtener una biodegradación total. El metabolito 3,4-DCA y gracias a la actuación de la enzima glutamina

sintetasa y transposasa, codificada por el gen *dcaQ* presente en las tres cepas bacterianas, se convierte en 4,5-diclorocatecol. Este mediante la enzima clorocatecol dioxigenasa (codificada por el gen *ccdC* que sólo está presente en *V. soli*) es degradado a 3-oxoadipato, un precursor de la molécula succinato del ciclo de Krebs, de la cual se obtiene finalmente CO_2 . Hay que decir que la cepa bacteriana *V. soli* es fundamental en esta ruta de degradación porque es la única capaz de eliminar el último metabolito tóxico que aparece (4,5-diclorocatecol).

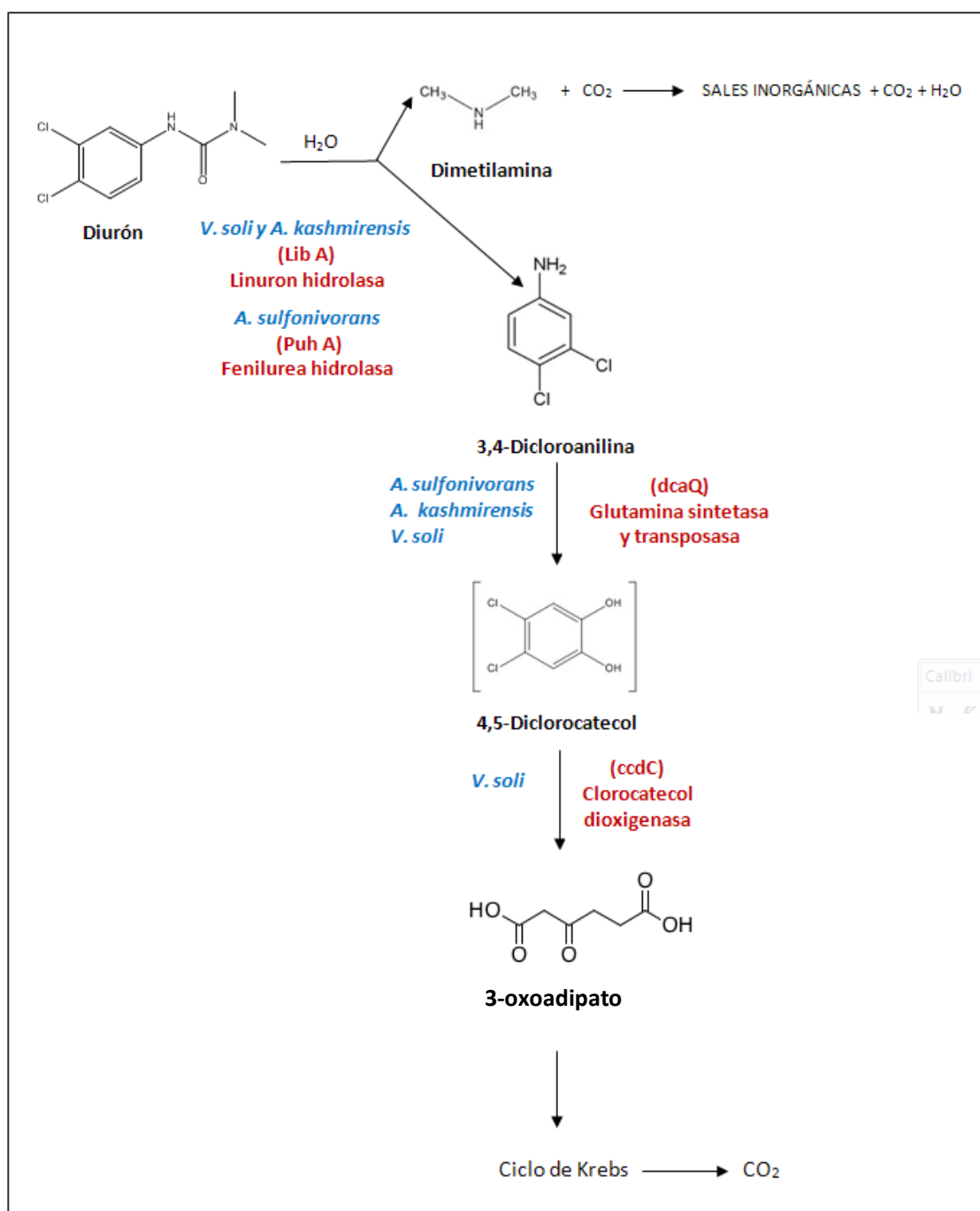


Figura 4.16. Ruta catabólica de la degradación de Diurón en presencia de las cepas bacterianas, *A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli* a través de los genes catabólicos específicos *Lib A*, *dcaQ* y *ccdC*. Esquema basado en la ruta catabólica de degradación de linuron en el estudio de Bers y col. (2011).

Actualmente, no existe mucha bibliografía que explique con detalle la ruta metabólica que realiza el Diurón hasta su completa eliminación. Giacomazzi y Cochet. (2004) investigaron dos rutas de biodegradación, una con cepas bacterianas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y otra inoculando hongos. Salvestrini y col. (2002) predijeron también una vía química de degradación de este herbicida, y Sorensen y col. (2003) propusieron unas rutas iniciales de biodegradación de Diurón con las cepas bacterianas *Arthrobacter globiformis* D47 y *Sphingomonas* sp. SRS2. Todos estos autores plantean dichas rutas pero no llegaron a detectar los genes específicos que codifican las enzimas responsables de la degradación del herbicida en las cepas estudiadas.

A partir de esta ruta metabólica se puede concluir que las tres cepas bacterianas estudiadas poseen, entre otros, genes degradadores específicos capaces de realizar de forma sinérgica y formando un perfecto consorcio bacteriano una biodegradación total de Diurón, corroborando de nuevo los resultados de biodegradación (Figura 4.12), y los estudios de mineralización (Figura 4.13).

4.4.4. Mineralización de Diurón con consorcios degradadores específicos procedentes de los suelos estudiados

La biorrecuperación medioambiental se refiere a un proceso de mejora del medio ambiente en el cual los microorganismos juegan un papel fundamental. Muchos microorganismos pueden adaptar su maquinaria metabólica y formar consorcios bacterianos para alimentarse de contaminantes indeseables alcanzando la biodegradación de éstos (Bonaventura y Johnson, 1997).

Al igual que se realizaron experiencias para comprobar que las cepas bacterianas degradadoras específicas llegaban a realizar una eliminación completa del herbicida Diurón en solución (mineralización), también se emplearon cinco consorcios, previamente aislados de los suelos CRF, PLD, PLS, FH y AL (C1, C2, C3, C4 y C5, respectivamente) tal como se describe en el apartado 3.2.7 de Materiales y Métodos, con el objetivo de saber si eran capaces de mineralizar Diurón. En estos experimentos el herbicida fue la única fuente de carbono y energía para estos consorcios (Tabla 2.9, tratamientos del 15 al 19 del apartado de Materiales y Métodos).

Los consorcios fueron inoculados una vez se había alcanzado la fase estacionaria de su crecimiento al igual que las cepas bacterianas. Por ese motivo se obtuvieron las curvas de crecimiento de los cinco consorcios bacterianos seleccionados para ser utilizados en los experimentos de mineralización, tal y como se describe en el apartado 3.2.7 del capítulo de Materiales y Métodos.

La Figura 4.17 muestra las curvas de crecimiento de los consorcios seleccionados en medio LB suplementados con Diurón (40 mg L^{-1}), en las que se representa el logaritmo de la densidad óptica, medida a una longitud de onda de 600 nm, frente al tiempo. En todos los casos se decidió que la toma de los cultivos para la preparación de los inóculos se llevara a cabo a las 20 horas de crecimiento (dentro de la fase estacionaria en todos los casos).

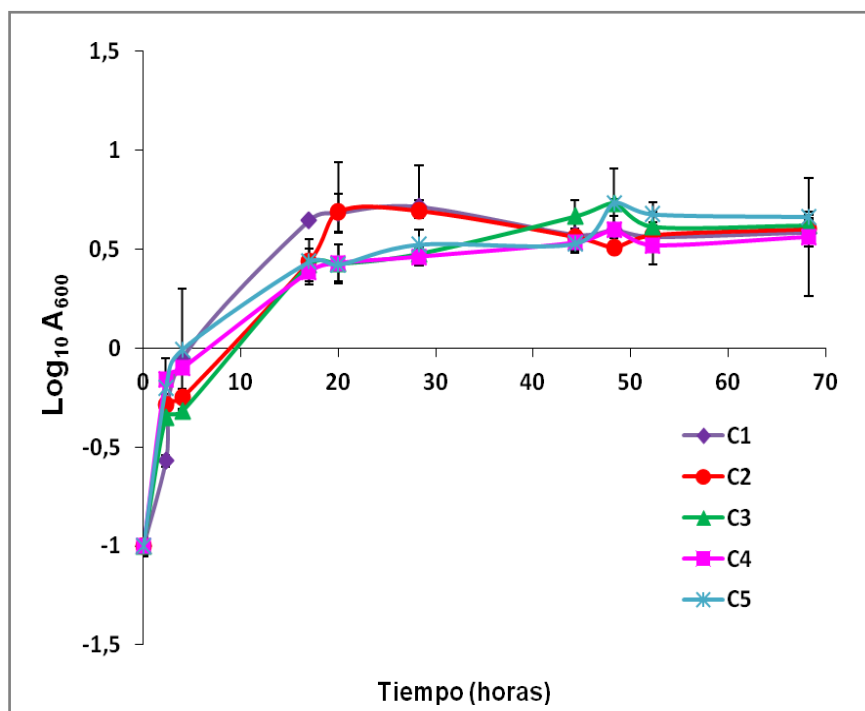


Figura 4.17. Curvas de crecimiento de los consorcios C1, C2, C3, C4 y C5 en medio LB y en presencia de Diurón (40 mg L^{-1}).

En la Figura 4.18 se muestran las curvas de mineralización de Diurón en medio MSM inoculado con los consorcios C1, C2, C3, C4 y C5. Los cinco consorcios bacterianos siguieron un modelo estándar de curva de mineralización como se explicó con anterioridad en el apartado 4.4.1 con tres estadios o fases claramente diferenciadas. En la Figura 4.18 se muestra también un ensayo control (sin ningún consorcio bacteriano), no observándose mineralización de Diurón a lo largo de todo el ensayo. En la Tabla 4.14 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos a partir de las curvas de mineralización Diurón en presencia de los consorcios bacterianos, las cuales fueron ajustadas y modelizadas siguiendo las recomendaciones incluidas en la guía FOCUS (2006). Todas las curvas de mineralización se ajustaron al modelo cinético de primer orden bifásica, Hockey-Stick (HS). La fase lag se calculó a partir del modelo cinético de primer orden bifásica Hockey-Stick (HS) modificado, (MHS) (FOCUS, 2006). Los parámetros incluidos en la Tabla 4.14 son: fase lag, extensión global de la mineralización (%), k_1 , k_2 , t_b y DT_{50} . Los 5 consorcios bacterianos inoculados en los ensayos fueron capaces de mineralizar Diurón, aunque con ciertas diferencias

entre cada uno de ellos. La principal se observó en la extensión global de la mineralización de Diurón, siendo del 65,0%, 88,6%, 22,9%, 83,2% y 65,4% para los consorcios C1, C2, C3, C4 y C5, respectivamente.

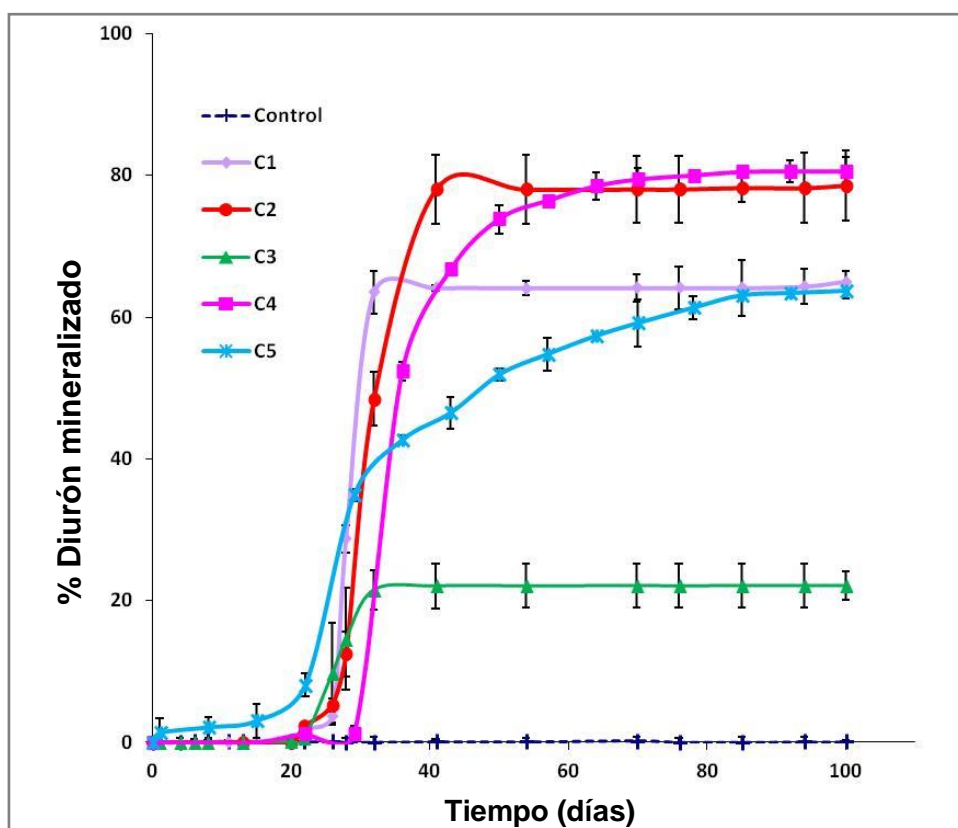


Figura 4.18. Curvas de mineralización de Diurón en medio MSM inoculado con los consorcios C1, C2, C3, C4 y C5.

Tabla 4.14. Parámetros cinéticos obtenidos a partir de las curvas de mineralización de Diurón en presencia de los 5 consorcios estudiados (C1, C2, C3, C4 y C5).

Consortios bacterianos	Modelo cinético	K_1 (día ⁻¹)	K_2 (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
C 1	HS	$2,3 \cdot 10^{-2}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	24,9	24,9	30,4	65,0
C 2	HS	$7,1 \cdot 10^{-2}$	$2,1 \cdot 10^{-2}$	39,4	25,2	29,7	88,6
C 3	HS	$2,0 \cdot 10^{-2}$	$5,0 \cdot 10^{-4}$	31,1	18,3	955	22,9
C 4	HS	$1,0 \cdot 10^{-1}$	$9,6 \cdot 10^{-3}$	52,1	30,0	36,6	83,2
C 5	HS	$2,4 \cdot 10^{-2}$	$6,1 \cdot 10^{-3}$	50,4	21,2	49,8	65,4

HS: modelo de cinética de primer orden bifásica, Hockey-Stick.

k_1 : constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k_2 : constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

La duración de la fase lag para estos cinco consorcios bacterianos osciló entre los 20 y 30 días. El consorcio C3 presenta una fase lag de 18,3 días, lo que indica que este consorcio bacteriano se adapta más rápidamente que los otros a la presencia de Diurón en el medio, comenzando a mineralizarlo antes, aunque es el consorcio bacteriano que alcanza la menor extensión global de mineralización. Estos consorcios necesitan un periodo de adaptación al medio y activar su actividad metabólica para comenzar a degradar dicho herbicida. La variación del tiempo de adaptación de los microorganismos potencialmente degradadores de cada flora endógena vendrá determinada por diversos motivos: proliferación, fabricación de enzimas específicas, adaptación genética, pudiendo ser causado también por crecimiento de otras poblaciones bacterianas, presencia de grupos tóxicos y/o aparición de nuevo genotipos que no sean capaces de degradar el producto de partida (Alexander, 2001).

Los porcentajes de mineralización observados corroboran que, efectivamente, los consorcios no sólo son degradadores específicos de Diurón, sino que además son capaces de llegar a mineralizarlo aunque no consiguen una mineralización total como se observó cuando se inocularon las tres cepas bacterianas estudiadas en esta memoria (*A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis*, *V. soli*). Esto hace pensar que llega un momento en el que los consorcios bacterianos ya no son capaces de mineralizar más, y las curvas de mineralización se encuentran en la fase estacionaria, siendo la tasa de mineralización en esta etapa menor que en la fase exponencial para todos los consorcios bacterianos (Tabla 4.14). Una explicación a estas fases estacionarias en los cinco consorcios bacterianos y a no llegar a mineralizar el 100% de Diurón, podría ser que el herbicida Diurón biodisponible que aún queda en solución se esté biodegradando dando lugar a metabolitos de este herbicida que sean tóxicos para estos consorcios bacterianos. Los efectos de los herbicidas en las comunidades microbianas de los suelos son importantes para la aprobación de éstos para ser usados en agricultura, pero las relaciones entre ambos no se predicen fácilmente. Ciertos herbicidas pueden favorecer el crecimiento de los microorganismos de suelos, en cambio, otros pueden originar efectos negativos o ningún efecto en situaciones reales (Lo y col. 2010).

En base a los resultados de mineralización en medio líquido obtenidos, para la realización de los posteriores estudios de mineralización en presencia de suelos reales se empleará como consorcio bacteriano únicamente el de las tres cepas bacterianas (*A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*) por ser el que en medio líquido no presentó apenas fase lag, la extensión global de mineralización fue completa (99,7%), y se produjo mayores tasas de mineralización (Tabla 4.11). Todo esto unido al hecho de que un elevado porcentaje de estas cepas bacterianas

permanecieran vivas después del tiempo del ensayo (Tabla 4.12), como se ha comprobado en el estudio de microscopía de epifluorescencia.

4.5. MINERALIZACIÓN DE DIURÓN EN SUELOS ESTÉRILES CON CEPAS BACTERIANAS DEGRADADORAS ESPECÍFICAS. EFECTO DE LA ADICIÓN DE HPBCD

Una vez seleccionado el consorcio bacteriano específico degradador del herbicida Diurón, formado por las cepas bacterianas *A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*, se comienza a investigar el efecto de la inoculación con dicho consorcio bacteriano en suelo, previamente esterilizados, con el objetivo de evaluar su capacidad de mineralizar Diurón en él, dónde la biodisponibilidad del contaminante podría verse reducida por los fenómenos de adsorción sobre las partículas del mismo. Por este motivo, se realizaron también estudios paralelos en presencia de HPBCD x10, ya que como se ha comprobado en experimentos previos (isotermas adsorción-desorción y lixiviación), la HPBCD posee la capacidad de aumentar la biodisponibilidad de este herbicida gracias a la formación de un complejo de inclusión, lo que favorecería el contacto entre los degradadores específicos y la fracción biodisponible del contaminante. En ambos estudios se añadieron, al igual que en los ensayos en medio líquido, nutrientes esenciales que resultan vitales para la activación del consorcio bacteriano. Estos dos tratamientos en los 10 suelos estudiados en la presente Tesis corresponden a los tratamientos 20 y 22 (Tabla 2.10) descritos en Materiales y Métodos.

En la Figura 4.19 se muestran las curvas de mineralización de Diurón en los 10 suelos estériles, observándose el efecto de la inoculación de dicho consorcio bacteriano (línea continua) y el efecto conjunto de la inoculación de este consorcio bacteriano en presencia de HPBCD x10 (línea discontinua). En la Tabla 4.15 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos de estas curvas de mineralización de Diurón, las cuales fueron ajustadas y modelizadas siguiendo las recomendaciones incluidas en la guía FOCUS (2006). Todas las curvas de mineralización se ajustaron al modelo de cinética de primer orden bifásica, Hockey-Stick (HS). Los parámetros incluidos en la Tabla 4.15 son: fase lag, extensión global de la mineralización (%), k_1 , k_2 , t_b y DT_{50} .

Como se observa en la Figura 4.19 (línea continua) y con los datos obtenidos una vez que han sido modelizadas estas curvas de mineralización de Diurón (Tabla 4.15), cuando éste consorcio bacteriano se aplica a suelos con diferentes propiedades físico-químicas, aunque no estén en condiciones reales (ya que están previamente esterilizados), la extensión global de mineralización en los 10 suelos comprende entre el 60,2 y el 98,9% mineralizado. Comparándolas con la mineralización en medio líquido, dónde se alcanzó el 99,8% de extensión global de mineralización (apartado 4.4.2) se observa que las propiedades físico-químicas de los suelos influyen en la

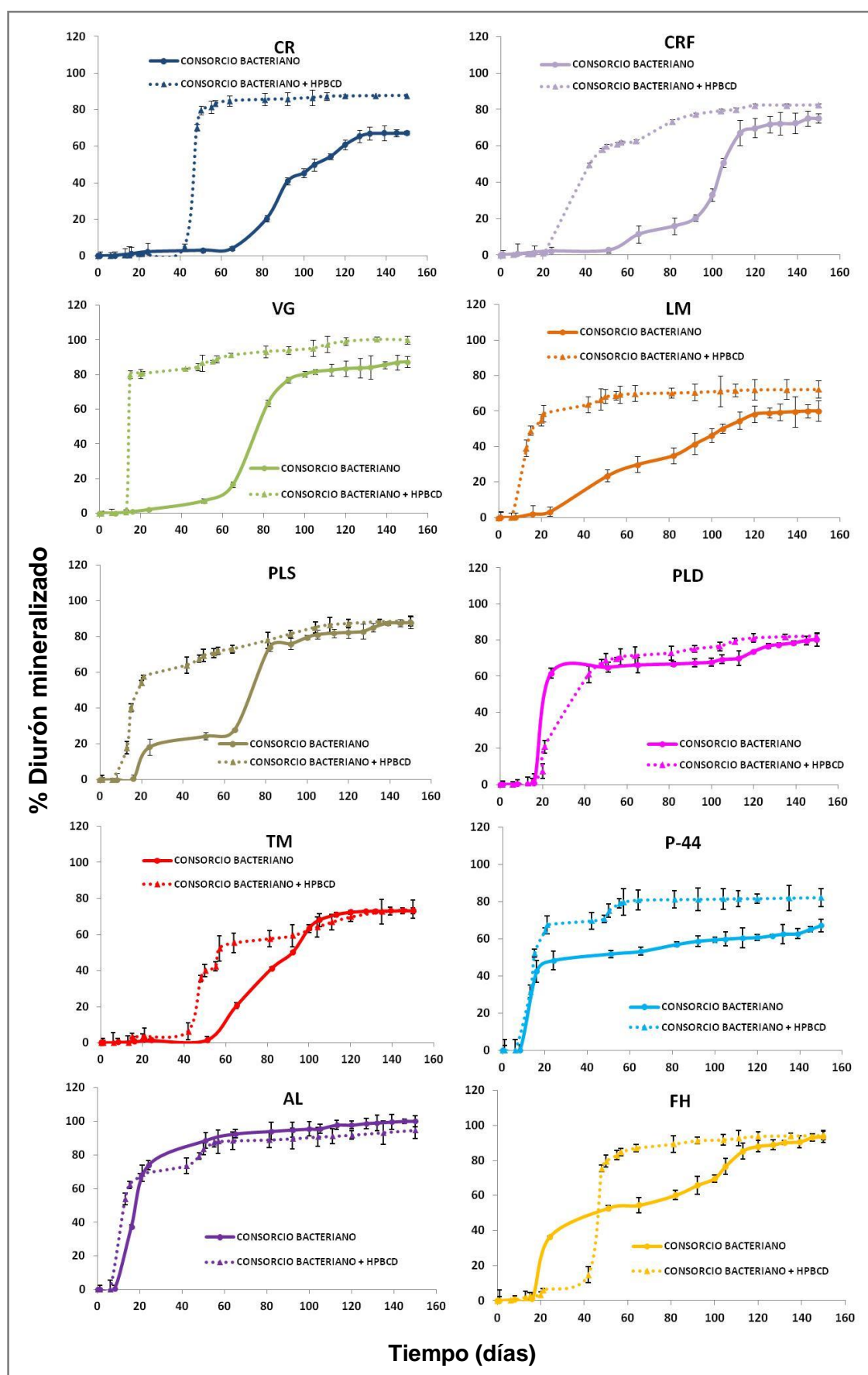


Figura 4.19. Curvas de mineralización de Diurón en 10 suelos estériles inoculados con las 3 cepas degradadoras específicas de Diurón formando un consorcio bacteriano (línea continua), y en presencia de HPBCD x10 (línea discontinua).

Tabla 4.15. Parámetros obtenidos en la mineralización de Diurón en los 10 suelos con las cepas bacterianas formando un consorcio y en presencia de HPBCD x10.

Suelos y Tratamientos	Modelo cinético	K ₁ (día ⁻¹)	K ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
CR							
SIN HPBCD	HS	2,1 10 ⁻²	3,0 10 ⁻³	131	66,2	116	67,5
CON HPBCD	HS	2,0 10 ⁻¹	4,1 10 ⁻³	50,7	41,7	45,3	88,6
CRF							
SIN HPBCD	HS	5,0 10 ⁻³	3,0 10 ⁻²	89,6	51,0	109	83,1
CON HPBCD	HS	5,0 10 ⁻²	1,2 10 ⁻²	41,7	24,1	42,8	87,1
VG							
SIN HPBCD	HS	2,0 10 ⁻³	3,2 10 ⁻²	98,6	53,1	118	94,9
CON HPBCD	HS	1,1 10 ⁻¹	2,0 10 ⁻²	14,3	13,0	13,6	97,9
LM							
SIN HPBCD	HS	8,1 10 ⁻³	31,2 10 ⁻³	130	22,7	108	60,2
CON HPBCD	HS	56,2 10 ⁻²	3,0 10 ⁻³	27,0	9,8	21,0	73,6
PLS							
SIN HPBCD	HS	7,0 10 ⁻³	3,0 10 ⁻²	65,7	17,8	75,5	93,7
CON HPBCD	HS	5,4 10 ⁻²	1,2 10 ⁻²	25,5	10,1	22,9	90,9
PLD							
SIN HPBCD	HS	1,1 10 ⁻¹	5,0 10 ⁻³	27,6	15,6	25,9	77,1
CON HPBCD	HS	3,4 10 ⁻²	6,2 10 ⁻³	53,8	19,6	39,8	83,1
TM							
SIN HPBCD	HS	2,0 10 ⁻²	9,1 10 ⁻⁴	128	60,0	96,1	73,2
CON HPBCD	HS	4,3 10 ⁻²	7,0 10 ⁻³	56,5	41,9	66,4	74,2
P44							
SIN HPBCD	HS	1,2 10 ⁻¹	3,5 10 ⁻³	11,7	7,32	43,5	65,4
CON HPBCD	HS	7,3 10 ⁻²	5,0 10 ⁻³	25,0	6,94	16,4	84,5
AL							
SIN HPBCD	HS	7,3 10 ⁻²	2,4 10 ⁻²	38,2	15,0	24,5	98,9
CON HPBCD	HS	1,6 10 ⁻¹	2,0 10 ⁻²	11,2	5,80	9,99	97,4
FH							
SIN HPBCD	HS	1,3 10 ⁻²	3,4 10 ⁻²	104	20,0	71,7	94,2
CON HPBCD	HS	3,0 10 ⁻¹	2,0 10 ⁻²	39,4	34,6	36,9	96,5

HS: modelo de cinética de primer orden bifásica, Hockey-Stick.

k₁: constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k₂: constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

adsorción, tal como se incluye en el apartado 4.2, y por lo tanto, en su fracción biodisponible potencialmente biodegradable o biodisponibilidad. Pero aun así, este consorcio bacteriano es capaz de alcanzar valores altos de mineralización. El suelo que presentó menor fase lag fue P44 (7,32 días), en cambio, el suelo CR tardó 66,2 días en alcanzar el 5% de mineralización. La DT_{50} para seis de los suelos fue alcanzada en 95 y 118 días aproximadamente, excepto para los suelos AL, PLD, P44 y PLS donde se alcanzaron antes (24,5, 25,9, 43,5 y 75,5 días, respectivamente). La degradación microbiana es el principal mecanismo de disipación de muchos compuestos orgánicos presentes en el suelo (Grant y col. 2002). La extensión y la velocidad de degradación microbiana están controladas por la biodisponibilidad de los contaminantes, que se define como la fracción libre que está disponible para atravesar la membrana celular de los organismos presentes en el medio en un momento determinado (Semple y col. 2004). Ello puede limitar la capacidad de los microorganismos presentes, en nuestro caso al consorcio bacteriano, para degradar los contaminantes retenidos en los mismos, dando lugar a un aumento en su persistencia, así como también al riesgo derivado de su prolongado efecto en el medio ambiente. Es por esto por lo que no se alcanza el 100% mineralizado, en la mayor parte de los suelos.

Los datos sobre la mineralización de Diurón observada tras la aplicación conjunta del consorcio bacteriano y HPBCD x10 a los suelos estudiados también se presentan en la Tabla 4.11. Para los 10 suelos la fase lag se acortó, excepto para los suelos PLD y FH donde los tiempos fueron similares (Tabla 4.15). Además, la extensión global de mineralización alcanzada con este tratamiento, aumenta en general con respecto al empleo sólo del consorcio bacteriano. El rango en los diferentes suelos es de 73,6% a 97,9%.

Como se ha confirmado en experimentos anteriores, el consorcio bacteriano necesita de una solución de nutrientes (SNs) para activarse y conseguir degradar al herbicida. En el apartado 4.4.2, dónde queda reflejado el ensayo de mineralización en solución (medio MSM) con las tres cepas bacterianas formando un consorcio en presencia de la SNs y a la misma concentración que el presente experimento (10 mg L^{-1}), no se observó fase lag o de aclimatación (Tabla 4.11), además de conseguir una completa mineralización del Diurón añadido inicialmente. Sin embargo, en presencia de los suelos sí se observa la aparición de una fase lag, la cual no puede ser explicada por la propia adaptación del consorcio, como lo confirmó el experimento en solución, y por lo tanto, la explicación se encontraría en la cantidad de Diurón adsorbido sobre las partículas del suelo que provocarían una reducción en la fracción biodisponible del plaguicida, es decir, un menor número de moléculas de Diurón estarían disponibles para ser atacadas por las enzimas excretadas por las cepas degradadoras específicas, lo que daría lugar a una disminución en la velocidad de degradación del herbicida (Mathews y col. 2002), ya que esta velocidad viene

determinada por la concentración del sustrato disponible. Partiendo de esta conclusión, se puede explicar cómo estas fases lag son debidas principalmente a la solubilidad del herbicida, a la menor cantidad de herbicida solubilizado.

En base a estas conclusiones previas de lo que está ocurriendo en estos sistemas sin la adición de agentes complejantes es necesario saber con exactitud qué ocurre cuando se añade HPBCD x10. Las CD no son tóxicas, son solubles en agua y son agentes biodegradables que poseen una cavidad hidrofóbica la cual forma un complejo de inclusión con este herbicida, como se comprobó en los ensayos de solubilidad, en las desorciones con HPBCD x10 y en las lixiviaciones en columnas de suelo (apartado 4.1, 4.2 y 4.3 de estos Resultados, respectivamente), aumentando su solubilidad y como consecuencia de ello, mejorando la biodisponibilidad y biodegradación de contaminantes tales como PAHs (Allan y col. 2007; Bardi y col. 2007) o herbicidas (Morillo y col. 2001; Villaverde y col. 2004, 2007; Cai y col. 2005). Por tanto, en la adición conjunta del inóculo y HPBCD X10 se observa como las constantes de mineralización son más rápidas (Tabla 4.15) y, en general, la extensión global de mineralización están por encima de los ensayos que no llevan incorporado HPBCD x10. Esto puede llevar a pensar que la HPBCD aumenta la disponibilidad de este herbicida bioestimulando a estas cepas bacterianas junto con la SNs y, esto hace que sean capaces de asimilar este herbicida en menor tiempo y comenzar antes el proceso de biodegradación.

Para comprobar si HPBCD pudiera servir como fuente de carbono para el consorcio degradador específico de Diurón investigado (formado por las tres cepas bacterianas estudiadas) se llevaron a cabo experimentos en presencia de CD y de Diurón, en medio R2A diluido 40 concluyéndose que en presencia del herbicida el consorcio bacteriano no empleó HPBCD como fuente de carbono o nutrientes esenciales para su crecimiento (Tabla 4.16), descartándose su función como bioestimulante, confirmándose a su vez la capacidad para acelerar la mineralización de Diurón al aumentar la fracción biodisponible en solución, teniendo los consorcios bacterianos más sustratos para biodegradar.

Tabla 4.16. Estudio en placas con R2A diluido 40 veces con y sin la adición de Diurón y HPBCD x10.

	R2A 1:40	R2A 1:40 + Diurón	R2A 1:40 + HPBCD x10	R2A 1:40 + Diurón +HPBCD x10
Consortio bacteriano	++	+++++	++	+++++

+++++: Máximo crecimiento bacteriano; ++: Mínimo crecimiento bacteriano.

4.6. BIORRECUPERACIÓN DE SUELOS ARTIFICIALMENTE CONTAMINADOS POR DIURÓN. ATENUACIÓN NATURAL ASISTIDA (ANA)

Hasta ahora los ensayos de mineralización han sido realizados en medio líquido y en suspensiones de suelo en condiciones de esterilidad, con el objetivo de investigar la eficacia descontaminante de bacterias y consorcios degradadores específicos que pudiesen ser empleados en procesos de bioaumentación. En este apartado se evaluará la capacidad de atenuación natural (AN) de suelos reales contaminados artificialmente con Diurón, así como la aplicación de distintas estrategias (bioestimulación, bioaumentación, incremento de la fracción biodisponible, etc.) con el objetivo de incrementar las tasas de mineralización en estos suelos reales (atenuación natural asistida, ANA) y así disminuir el tiempo empleado en el proceso de recuperación del suelo (Atlas y Philips, 2005; Zhao y col. 2011)

El empleo de la propia capacidad de atenuación de la contaminación del suelo como estrategia para conseguir una biorrecuperación del mismo, presenta actualmente una opción atractiva de descontaminación (Aburto-Medina y col. 2012). Esta técnica es utilizada para el tratamiento de diversas zonas contaminadas por el reducido coste económico durante los procesos de descontaminación (Aburto y col. 2009; Fahy y col. 2005). Sin embargo, la AN podría resultar un proceso largo dependiendo de las características y condiciones medioambientales.

4.6.1. Experimentos con suelos en suspensión

4.6.1.1. Atenuación natural asistida (ANA). Bioestimulación con nutrientes

El estudio de estos experimentos fue comprobar si los 10 suelos empleados en la Tesis (Tabla 2.1) poseían una potencial capacidad de atenuación natural por el herbicida Diurón, no llegándose a observar mineralización sin la adición de 1 mL de la solución de nutrientes (SNs) es decir, necesitándose de una estimulación de la flora endógena de los suelos investigados. La capacidad del suelo para recuperarse de la contaminación de herbicidas muy persistentes depende principalmente de la presencia de microorganismos con capacidad para biodegradar (Caracciolo y col. 2013), pero en la mayoría de los casos éstos requerirán de una pequeña activación (bioestimulación) que consiga acelerar la mineralización del contaminante (Aburto-Medina y col. 2012).

Para llevar a cabo este estudio los suelos fueron dopados con Diurón a una concentración de 50 mg kg⁻¹ y 1 mL de SNs (Tabla 2.10, Tratamiento 23). En la Figura 4.20 a y b se muestran las curvas de mineralización de Diurón alcanzada por la flora autóctona de los 10 suelos previamente dopados con este herbicida (50 mg Kg⁻¹) donde se representa el porcentaje acumulado de Diurón mineralizado frente al tiempo. Las curvas de mineralización obtenidas siguieron en la mayoría de

los suelos estudiados el modelo estándar de curva de mineralización con tres estados o fases diferenciadas. En la Tabla 4.17 se muestran los parámetros cinéticos a partir de estas experiencias. Para calcular estos parámetros se han conseguido las recomendaciones incluidas en la guía FOCUS (2006) descrita en el apartado 3.2.7. Todas las mineralizaciones se ajustaron al modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick (HS), excepto la mineralización en el suelo P44, que se ajustó al modelo de cinética de primer orden simple (SFO).

Tal como se observa en las Figuras 4.20 a y b y en la Tabla 4.17, existen diferencias significativas en las mineralizaciones llevadas a cabo en los suelos investigados.

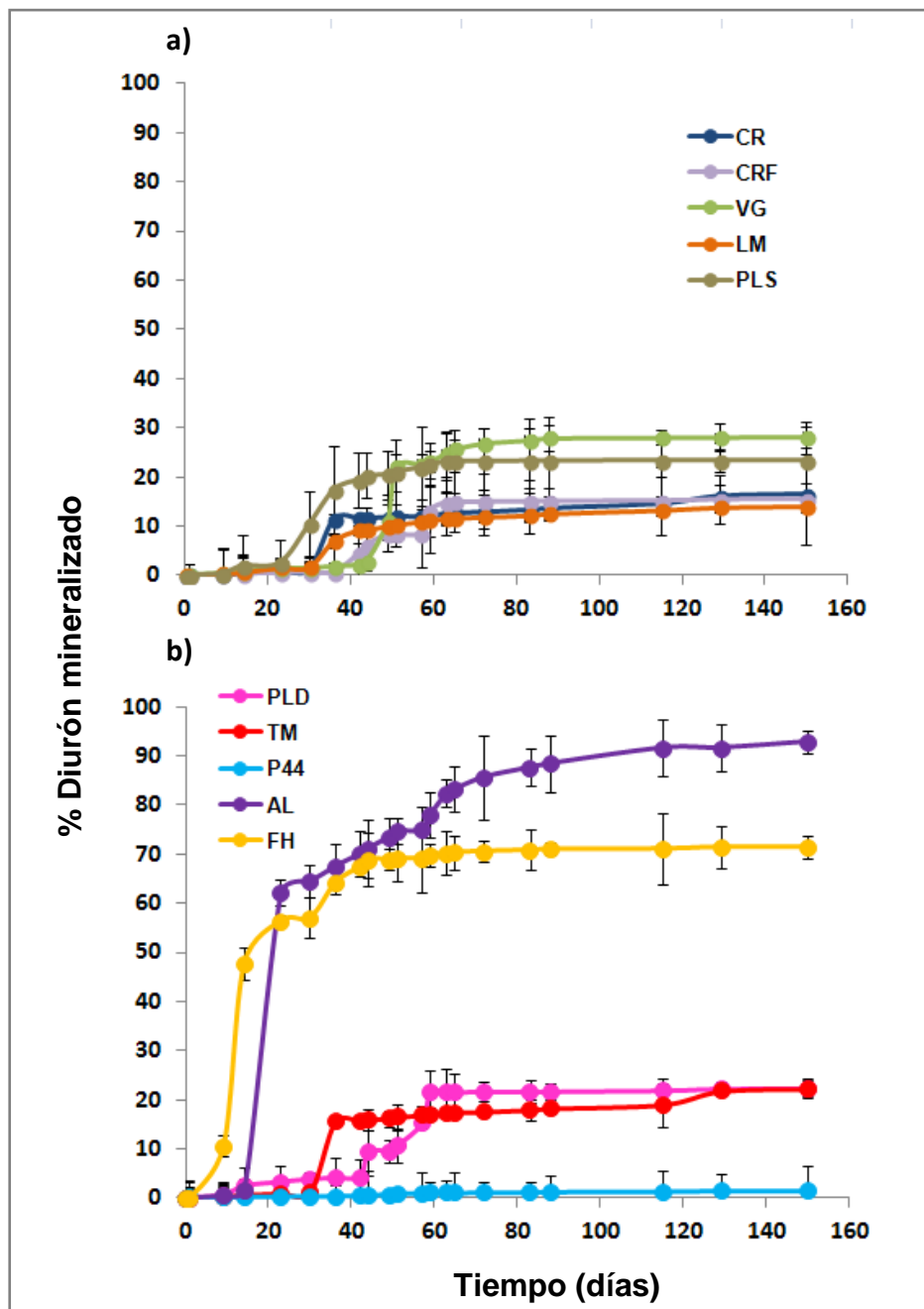


Figura 4.20. a) y b). Curvas de mineralización de Diurón (50 mg kg^{-1}) en presencia de la solución de nutrientes (SNs) en los suelos: **a)** CR, CRF, VG, LM y PLS y **b)** PLD, TM, P44, AL y FH.

Tabla 4.17. Parámetros cinéticos calculados a partir de las mineralizaciones de Diurón por la flora endógena en presencia de SNs en los suelos estudiados, y las UFC (unidades formadoras de colonias) potenciales específicas degradadoras de Diurón.

Suelos	Modelo cinético	K_1 (día ⁻¹)	K_2 (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)	UFC (g ⁻¹)
CR	HS	2,1 10 ⁻²	5,4 10 ⁻⁴	35,0	30,0	1127	16,5	52 x 10 ³
CRF	HS	5,1 10 ⁻³	9,0 10 ⁻⁵	68,0	39,0	6297	15,5	81 x 10 ³
VG	HS	2,8 10 ⁻²	7,1 10 ⁻⁴	56,4	47,0	665	29,4	140 x 10 ³
LM	HS	5,8 10 ⁻³	4,3 10 ⁻⁴	44,8	30,0	1459	14,4	40 x 10 ³
PLS	HS	7,7 10 ⁻³	2,5 10 ⁻⁴	56,6	24,0	1788	24,0	36 x 10 ⁴
PLD	HS	9,1 10 ⁻³	1,2 10 ⁻⁴	62,9	41,9	4389	22,3	24 x 10 ⁴
TM	HS	7,7 10 ⁻²	7,1 10 ⁻⁴	34,0	32,0	794	22,1	203 x 10 ³
P44	SFO	1,2 10 ⁻⁴	-	-	-	5887	1,81	75 x 10 ²
AL	HS	1,5 10 ⁻¹	1,7 10 ⁻²	19,4	13,6	18,3	95,6	95 x 10 ⁴
FH	HS	2,7 10 ⁻²	8,3 10 ⁻⁴	54,5	8,01	33,2	71,8	35 x 10 ⁵

Las mineralizaciones se ajustaron al modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick (HS), excepto la mineralización en el suelo P44, que se ajustó al modelo de cinética de primer orden simple (SFO).

k_1 : constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k_2 : constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

La extensión global más alta de mineralización se dio en los suelos AL y FH (95,6% y 71,8%, respectivamente). En cambio, en el suelo P44, no se produjo mineralización, es decir, los microorganismos de este suelo no son capaces de degradar Diurón aun siendo bioestimulados con una SNs (1,81% Diurón mineralizado). El resto de los suelos alcanzaron unas mineralizaciones que oscilaron entre 14,4% y 29,4% del herbicida mineralizado (LM y VG respectivamente).

La fase lag que presentaron los suelos CR, CRF, VG, LM, PLS, PLD y TM estuvo comprendida entre 24 y 47 días (PLS y VG, respectivamente). Las dos fases lag más pequeñas fueron las de los suelos AL y FH, siendo 13,6 y 8 días respectivamente. Por tanto, se concluye que los microorganismos autóctonos del suelo FH son los que más rápidamente logran adaptarse a la presencia de Diurón y comienzan su mineralización.

Si se tienen en cuenta los resultados obtenidos a partir de las mineralizaciones llevadas a cabo en presencia del consorcio degradador específico en los suelos en condiciones de esterilidad, se observa como la atenuación natural mediada por los degradadores autóctonos supone un importante incremento en el tiempo necesario para conseguir eliminar la fracción biodisponible de Diurón en prácticamente todos los suelos investigados, es decir, los valores de DT_{50} resultan ser sensiblemente mayores, excepto en el suelo FH, donde se demostró cómo su propia flora poseía degradadores específicos de Diurón altamente adaptados al contaminante con un valor similar en la extensión global de mineralización (71,8%) y un tiempo de aclimatación menor (8,01 días) que cuando se evaluó la capacidad de mineralización del consorcio degradador (20,0 días) (Tabla 4.15). Igualmente, es destacable cómo la fase lag se vio reducida en 5 de los 10 suelos estudiados (CR, CRF, VG, AL y FH) cuando la mineralización se llevó a cabo por los microorganismos autóctonos. Fenlon y col. (2011), concluyeron que la mineralización de isoproturon (fenilurea) fue dependiente de la repetida aplicación del herbicida en un suelo agrícola, provocando una rápida respuesta de la flora endógena hacia dicho herbicida.

Los resultados de mineralización obtenidos en cada suelo se pueden relacionar con el contenido en unidades formadoras de colonias (UFC) potencialmente degradadores específicos de Diurón presentes en cada uno de ellos. Los suelos CR, LM y CRF, que prácticamente alcanzan el mismo porcentaje final de Diurón mineralizado (16,5, 14,4 y 15,5%, respectivamente), poseían 52×10^3 , 40×10^3 y 81×10^3 UFC g^{-1} , potenciales degradadores específicos de Diurón, respectivamente. Los siguientes porcentajes de mineralización superiores a éstos son los de los suelos VG, PLS, TM y PLD (29,4, 24,0, 22,1 y 22,3%, respectivamente), donde las UFC son ligeramente mayores a los anteriores, 140×10^3 , 36×10^4 , 203×10^3 , 24×10^4 UFC g^{-1} , y ello concuerda con el hecho de que los suelos FH y AL, que son precisamente los que mayor valor tienen (35×10^5 y 95×10^4 UFC g^{-1}) tuvieron una tasa de mineralización de Diurón de 71,8 y 95,6 %. El suelo P44, fue aquel en el que no se llegó a alcanzar mineralización, presentando el número más bajo de UFC g^{-1} (75×10^2). Towell y col. (2011a) observaron en un estudio de mineralización de PAHs en 3 suelos con diferentes UFC una mejoría en la biodegradación de estos hidrocarburos en el suelo que presentaba mayor cantidad de UFC, y además afirmaban que la biorrecuperación de un suelo depende principalmente del tipo de suelo y de la presencia de la flora endógena degradadora específica del contaminante. La flora endógena de cada suelo requiere un periodo de adaptación para que proliferen, se activen y comiencen a mineralizar (Lendvay y col. 2003). Además, la producción de enzimas específicas y la adaptación genética son otros factores a tener en cuenta (Van der Meer y col. 1992; Suett y col. 1996; Fenlon y col. 2011). Es decir, aunque en esta memoria se hayan podido determinar claras correlaciones entre la capacidad de atenuación

natural de los suelos investigados y el contenido total de degradadores potenciales de Diurón, el análisis cualitativo basado en estudios moleculares ayudará a establecer de una forma más específica estos resultados.

Para corroborar esto, se llevó a cabo la caracterización molecular de los microorganismos presentes en cada suelo de la misma manera que para las cepas degradadoras específicas pero empleando el kit de extracción PowerLyzer™ PowerSoil® DNA Isolation Kit que es específico para la extracción de ADN en suelo (apartado 3.2.8.3 de Métodos). En la Tabla 4.18 se muestran los datos obtenidos una vez que se realizó el protocolo de extracción. En el suelo LM y PLD, aun concentrando la cantidad de ADN de estos suelos, no se pudo determinar cantidad suficiente de ADN y por tanto, no se llevó a cabo la identificación de los genes específicos en dichos suelos.

En la Tabla 4.18 también se presentan los genes específicos degradadores de Diurón analizados en PCR. De los 10 suelos que se han estudiados, solo en 7 suelos se han detectado genes específicos que forman parte de la ruta metabólica de Diurón detallada en el apartado 4.4.3 (Figura 4.16). En los suelos LM y PLD, como se ha mencionado anteriormente, por falta de cantidad de ADN y en el suelo P44, en el cual si se consiguió cantidad suficiente de ADN ($132,5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), no presentaron ningún gen específico del herbicida Diurón (Figura 4.18).

Tabla 4.18. Cantidad de ADN de los suelos estudiados y detección de fragmentos de genes que codifican la síntesis de enzimas de la ruta de degradación de Diurón.

Suelos	Cantidad de ADN después de ser concentrado ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	Resultados PCR (Genes identificados en los suelos)	Función de los genes identificados *
CR	68,10	Puh A	Fenilurea hidrolasa
CRF	138	dcaQ	Glutamina sintetasa y transposasa
VG	1580	ccdC	Clorocatecol dioxigenasa
PLS	217	dcaQ/ccdC	Glutamina sintetasa y transposasa /Clorocatecol dioxigenasa
TM	115	Puh A	Fenilurea hidrolasa
P44	132,5	-	-
AL	124,7	Puh A	Fenilurea hidrolasa
FH	212,1	Puh B	Fenilurea hidrolasa

* Bers y col. (2011).

En los suelos CR, TM y AL se detectó la presencia del gen Puh A correspondiente para la enzima fenilurea hidrolasa. En el suelo FH se determinó la presencia del gen Puh B, el cual también codifica para una fenilurea hidrolasa. La ruta metabólica del herbicida Diurón (Figura 4.16) empieza con la hidrólisis del grupo amida del Diurón dando lugar a dimetilamina y 3,4-DCA por los genes Lib A, Puh A o Puh B que codifican para las enzimas linurón hidrolasa y fenilurea hidrolasa, respectivamente.

En estos suelos solo aparecen Puh A o Puh B, pero ninguno de los otros genes propuestos para este herbicida en su ruta de biodegradación, por lo que quedaría presente en el medio 3,4-DCA. Como ya se ha comentado en varias ocasiones éste metabolito es difícil de eliminar del medio ambiente y es más tóxico que la propia molécula del herbicida Diurón (Widehem y col. 2002). De ahí, que en la mineralización estudiada en este apartado en los suelos CR y TM solo se alcance un 16,5 y 22,1% de extensión global debido a la toxicidad que presenta dicho metabolito, provocando la muerte de gran parte de la flora autóctona de cada suelo. En cambio, estos genes, Puh A y Puh B, también se encuentran en los suelos AL y FH, respectivamente, en los cuales se alcanzan unas mineralizaciones muy elevadas (95,6 y 71,8%, respectivamente). Estos dos suelos son los que presentan mayor contenido en MO de los 10 suelos estudiados, pudiéndose afirmar que existirán otros microorganismos (bacterias, hongos o protozoos) que se encuentren en dichos suelos y mediante otras rutas metabólicas consigan biodegradar totalmente a este herbicida.

En los suelos PLS y CRF está presente el gen dcaQ, el cual en la ruta metabólica del herbicida Diurón (Figura 4.16), gracias a la actuación de la enzima glutamina sintetasa y transposasa, codificada por este gen, convierte al metabolito 3,4-DCA en 4,5-diclorocatecol. Y, en el suelo VG y de nuevo en el suelo PLS existe el gen ccdC, el cual codifica a la enzima clorocatecol dioxigenasa y la molécula 4,5-diclorocatecol es degradada a 3-oxoadipato, un precursor de la molécula succinato del ciclo de Krebs, de la cual se obtiene finalmente CO₂. En estos suelos, los genes que están presentes se sitúan en la ruta metabólica descrita anteriormente (Figura 4.16) en las últimas partes de esta vía de degradación. Es decir, los microorganismos presentes en dichos suelos (PLS, CRF y VG) comenzarán la biodegradación con otras enzimas codificadas por otros genes capaces de biodegradar Diurón, pero menos específicas que las que han sido estudiadas en esta memoria para el consorcio bacteriano (formado por *A. sulfonivorans*, *V. soli* y *A. kashmirensis*) puesto que se alcanza una mineralización baja en estos suelos (24,0, 15,5 y 29,4% en PLS, CRF y VG, respectivamente).

4.6.1.2. Atenuación natural asistida por la aplicación de HPBCD

Las experiencias para estudiar el efecto de la adición de HPBCD x10 en la mineralización se han llevado a cabo en 6 suelos (CR, VG, LM, PLD, TM y P44). El objetivo de este ensayo fue observar si la aplicación de HPBCD era capaz de provocar un incremento en la fracción biodisponible en el sistema suelo-agua de Diurón.

En la Figura 4.21 se muestran las curvas de mineralización de Diurón alcanzadas por la flora endógena tras la aplicación de SNs y HPBCD x10 para los 6 suelos seleccionados. En la Tabla 4.19 se muestran los datos obtenidos en los 4 tratamientos diferentes que se abordan desde el apartado anterior, en el presente apartado y en los dos siguientes de la Tesis: Tratamiento 23: Flora endógena + SNs, comentado en el apartado anterior; Tratamiento 24: Flora endógena + SNs + HPBCD; Tratamiento 25: Flora endógena + SNs + Consorcio bacteriano; Tratamiento 26: Flora endógena + SNs + Consorcio bacteriano + HPBCD.

La atenuación natural asistida por la aplicación de CD, fue llevada a cabo dopando los suelos con Diurón a una concentración de 50 mg kg^{-1} , y añadiendo 1 mL de SNs y HPBCD x10 (Tabla 2.10, Tratamiento 24). Todas las mineralizaciones se ajustaron al modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick (HS). En la Tabla 4.19 se observan los parámetros de las cinéticas obtenidos en estos suelos estudiados: k_1 , k_2 , t_b , la fase lag, DT_{50} , y la extensión global de mineralización.

En general, se observa claramente que la HPBCD x10 (Tratamiento 24) provoca un aumento en la extensión global de mineralización en todos los suelos estudiados, especialmente en el caso del suelo P44 en el cual no se observó mineralización ninguna al aplicar la SNs (Tabla 4.19, Tratamiento 23) y, en cambio, con la adición de HPBCD x10 se aprecia un gran aumento alcanzando una extensión global de mineralización de 46,7% (Tabla 4.19).

La DT_{50} , tiempo que se tarda en alcanzar el 50% de mineralización de Diurón inicial añadido, disminuye en los 6 suelos con respecto al tratamiento 23 (Tabla 4.19), resultando destacable la DT_{50} observada en los suelos PLD y P44, cuya reducción fue 18 y 25 veces mayor respecto a la sola adición de la SNs (Tabla 4.19).

Respecto a la duración de la fase lag, sería esperable observar un acortamiento de la misma al aplicar HPBCD x10, tal y como ocurrió en los experimentos en condiciones de esterilidad (Figura 4.19). Sin embargo la presencia de la flora endógena ha provocado que sólo en algunos de los suelos estudiados este efecto ocurra (VG, PLD) algo que se puede explicar por la competencia entre el herbicida y HPBCD siendo empleados como fuente de carbono por esa flora, especialmente en el caso del suelo P44 (Figura 4.21) ya que se trata de un compuesto biodegradable (Fenyvesi y col. 2005).

Por tanto, estos resultados nos llevan a concluir que la aplicación de HPBCD x10 da lugar a un aumento en la tasa de mineralización de Diurón en un suelo contaminado, en condiciones más cercanas a la realidad (suelos no estériles), gracias a la formación de un complejo de inclusión que provoca un aumento en la solubilidad del herbicida y por lo tanto, una mayor biodisponibilidad como se comprobó en el apartado 4.5 de éstos Resultados empleando los mismos suelos pero en condiciones de esterilidad.

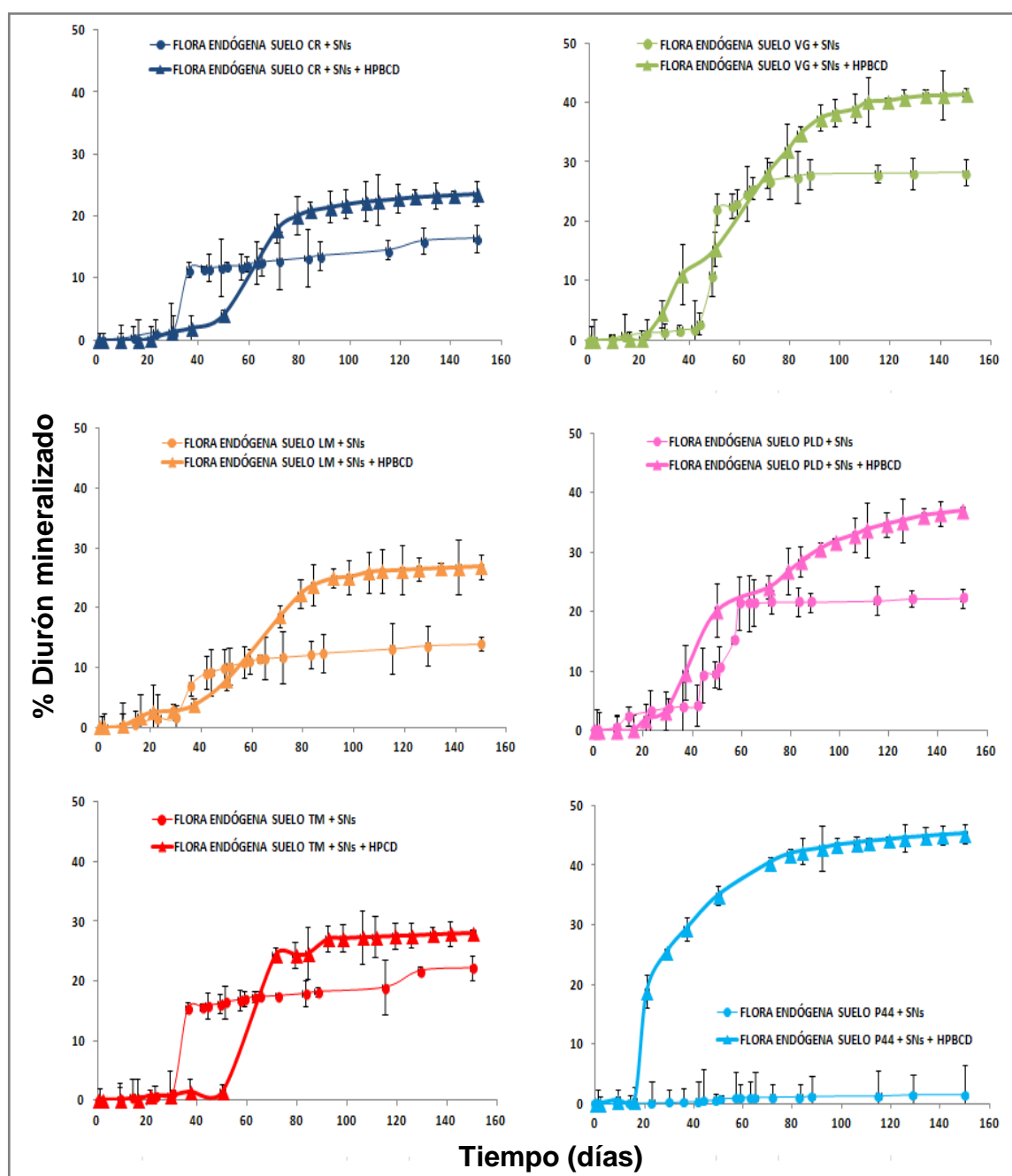


Figura 4.21. Curvas de mineralización de Diurón comparando 2 tratamientos basados en la atenuación natural asistida por: solución de nutrientes (SNs) (Tratamiento 23) y SNs + HPBCD x10 (Tratamiento 24).

Tabla 4.19. Parámetros cinéticos (k_1 , k_2 , tb , fase lag y DT_{50}) obtenidos a partir de las mineralizaciones de Diurón en los 10 suelos y sometidos a 4 tratamientos diferentes.

Suelos y Tratamientos *	Modelo cinético	K ₁ (día ⁻¹)	K ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)	
CR	23	HS	2,1 10 ⁻²	5,4 10 ⁻⁴	35,0	30,0	1127	16,5
	24	HS	5,3 10 ⁻³	5,1 10 ⁻⁴	96,5	52,0	991	23,9
	25	HS	3,6 10 ⁻³	5,0 10 ⁻⁴	81,3	25,0	1058	22,9
	26	HS	8,0 10 ⁻³	4,7 10 ⁻⁴	38,5	10,0	1022	26,0
VG	23	HS	2,8 10 ⁻²	7,1 10 ⁻⁴	56,4	47,0	665	29,4
	24	HS	6,6 10 ⁻³	1,0 10 ⁻³	102	28,0	305	41,9
	25	HS	1,9 10 ⁻¹	1,2 10 ⁻³	17,0	15,0	278	42,4
	26	HS	4,0 10 ⁻²	9,6 10 ⁻⁴	25,8	16,0	354	43,8
LM	23	HS	5,8 10 ⁻³	4,3 10 ⁻⁴	44,8	30,0	1459	14,4
	24	HS	5,2 10 ⁻³	4,4 10 ⁻⁴	87,9	37,6	1080	27,1
	25	HS	5,2 10 ⁻²	3,0 10 ⁻³	15,0	10,0	175	47,9
	26	HS	1,3 10 ⁻²	1,3 10 ⁻³	48,3	2,03	111	58,0
PLD	23	HS	9,1 10 ⁻³	1,2 10 ⁻⁴	62,9	41,9	4390	22,3
	24	HS	9,2 10 ⁻³	2,5 10 ⁻³	51,2	27,1	238	39,3
	25	HS	7,8 10 ⁻³	8,9 10 ⁻⁴	34,1	19,0	684	21,9
	26	HS	1,1 10 ⁻²	1,2 10 ⁻³	37,5	13,1	378	36,5
TM	23	HS	7,7 10 ⁻²	7,1 10 ⁻⁴	34,0	32,0	794	22,1
	24	HS	1,410 ⁻²	6,7 10 ⁻⁴	70,4	50,0	694	28,8
	25	HS	3,5 10 ⁻²	1,6 10 ⁻³	25,3	10,0	129	52,4
	26	HS	3,6 10 ⁻²	2,0 10 ⁻³	31,8	10,0	29	63,9
P44	23	SFO	1,2 10 ⁻⁴	-	-	-	5887	1,81
	24	HS	1,6 10 ⁻²	1,5 10 ⁻³	42,6	17,0	233	46,7
	25	HS	1,5 10 ⁻²	4,5 10 ⁻³	52,4	8,73	63	69,0
	26	HS	6,0 10 ⁻²	2,0 10 ⁻³	35,9	15,9	28	76,0

(*) Tratamiento 23: *Flora endógena* + SNs;Tratamiento 24: *Flora endógena* + SNs + HPBCD;Tratamiento 25: *Flora endógena* + SNs + Consorcio bacteriano;Tratamiento 26: *Flora endógena* + SNs + Consorcio bacteriano + HPBCD.

SFO: Modelo cinético simple de primer orden; HS: Modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick.

 k_1 : constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹). k_2 : constante de mineralización después de tb (días⁻¹). tb : tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días). DT_{50} : tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

4.6.1.3. Bioaumentación con el consorcio bacteriano formado por las 3 cepas degradadoras específicas de Diurón

El objetivo de este experimento es estudiar el efecto de inocular las tres cepas bacterianas degradadoras específicas de Diurón investigadas en la presente memoria formando un consorcio bacteriano en los 6 suelos seleccionados (CR, VG, LM, PLD, TM y P44) en estudios de mineralización, con respecto al efecto que se observó en presencia únicamente de los microorganismos autóctonos de dichos suelos y los nutrientes (SNs, Tratamiento 23). Estas mineralizaciones corresponden al Tratamiento 25 de la Tabla 2.10 de Materiales y Métodos.

En la Figura 4.22 se muestran las curvas de mineralización de Diurón en los 6 suelos anteriormente mencionados y dopados con 50 mg Kg⁻¹ del herbicida, 1 mL de SNs e inoculados con *A. sulfonivorans*, *V. soli* y *A. kashmirensis*. En la Tabla 4.19 se muestran los datos obtenidos de dichas mineralizaciones (Tratamiento 25).

En estos ensayos, la duración de la fase lag se vio fuertemente reducida si se compara con la observada en presencia de la SNs (Tratamiento 23), presentando un periodo de aclimatación entre 10 y 20 días en los suelos investigados. Igualmente, en general en todos los suelos estudiados la cantidad global de Diurón mineralizada fue superior a aquella observada en presencia de la SNs, siendo de nuevo muy destacable este incremento en el suelo P44 donde en presencia de la SNs sólo se alcanzó un 1,81% y en presencia del consorcio bacteriano un 69,0%. En cuanto a los parámetros cinéticos, tasa de mineralización y DT₅₀ en general estos fueron mejorados observándose una drástica reducción en la DT₅₀ por los suelos LM, TM y P44 respecto a los tratamientos 23 y 24 (175, 129 y 63 días, respectivamente).

Comparando ambos tratamientos (23 y 25) en estos ensayos de mineralización se puede llegar a concluir que las cepas bacterianas necesitan un periodo de adaptación menor que el requerido por la flora endógena de cada uno de los suelos estudiados, además de no observarse una competencia entre los degradadores específicos y la flora autóctona del propio suelo, presentando una capacidad para trabajar de manera sinérgica para hacer más efectiva la degradación de Diurón. Esto ocurrió en todos los suelos excepto en el caso del suelo PLD donde el porcentaje final del herbicida mineralizado tras la inoculación de las cepas bacterianas fue muy similar al obtenido por los microorganismos autóctonos del suelo (21,9 y 22,3%, respectivamente).

Hay que tener en cuenta que los inóculos empleados de las cepas contenía 10⁸ UFC, por lo que los suelos además de que se están inoculando con degradadores específicos de Diurón, éstos además van a estar presentes en el medio a una concentración superior a la de los microorganismos autóctonos potenciales degradadores del herbicida que presentan cada suelo.

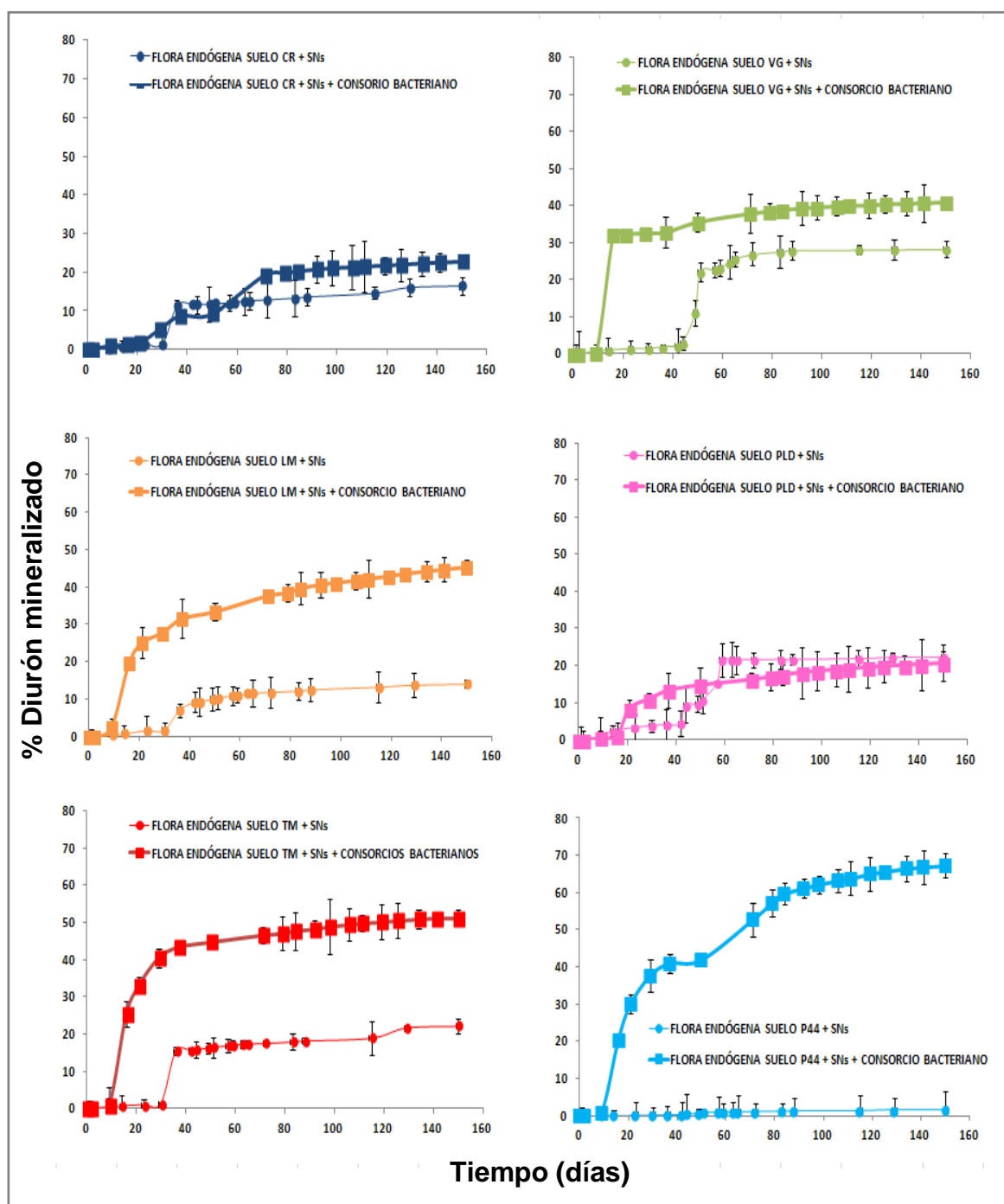


Figura 4.22. Curvas de mineralización de Diurón. Biestimulación (SNs) y bioaumentación con los degradadores específicos de este herbicida.

El hecho de que el suelo PLD es el que presenta el mayor número de microorganismos autóctonos potenciales degradadores de Diurón (24×10^4 UFC) antes de la inoculación con estas tres cepas bacterianas, puede dar lugar a una mayor competencia entre éstos y las nuevas cepas inoculadas en el medio, dando como resultado que la variación en el porcentaje final de Diurón mineralizado entre ambos sistemas sea despreciable.

En cambio, los suelos CR, VG, LM, TM y P44 presentan un menor número de microorganismos autóctonos potenciales degradadores de Diurón (52×10^3 , 140×10^3 , 40×10^3 , 203×10^3 y 75×10^2 , respectivamente), lo que hace que sea más significativo el efecto de la presencia de estas tres cepas bacterianas aumentando de este modo la mineralización, sobre todo en el suelo P44 que al estar presente estas cepas bacterianas mineraliza un 68,99%. Li y col. (2009) afirmaron que al añadir un consorcio bacteriano a un suelo se mejoraba la biodegradación de PAHs con respecto a la mineralización que conseguía la flora endógena de este suelo mejorando la degradación significativamente (41,3%). Jacques y col. (2008), observaron que al inocular degradadores específicos, una bacteria y un hongo (*Pseudomona putida* y *Pythium ultimum*), formando un consorcio la mineralización global de antraceno en un suelo contaminado a 500 mg kg^{-1} , era 312% mayor respecto a la inoculación de cada microorganismo de manera aislada en 70 días. Aburto-Medina y col. (2012), hicieron un estudio comparativo donde por un lado estudiaron la atenuación natural asistida y por otro, realizaron un ensayo de bioaumentación con microorganismos exógenos observando una mejora en este último tratamiento concluyendo que se trata de una efectiva técnica de biorrecuperación.

Existen muchas conclusiones acerca del uso de los inóculos microbianos degradadores específicos en la recuperación de suelos contaminados, ya que en algunos estudios se ha observado un incremento en la degradación del contaminante (Bento y col. 2005; Thompson y col. 2005), mientras que en otros se ha observado un efecto negativo en su degradación (Thomassin-Lacroix y col. 2002). Por ejemplo, Towell y col. (2011b), estudiaron, en un suelo agrícola, el efecto de la adición de tres inóculos bacterianos degradadores en la mineralización de ^{14}C -fenildodecano. Cada uno de los inóculos se adicionó al suelo a tres concentraciones distintas. Salvo cuando los inóculos se adicionaron a la concentración más baja de las tres empleadas, obtuvieron que la duración de la fase lag en las curvas de mineralización fue mayor que cuando no se adicionó ningún inóculo. En todos los casos la tasa máxima de mineralización de ^{14}C aumentó tras la adición de los inóculos. Sorensen y col. (2008) también comprobaron que cuando un suelo se inoculaba con dos cepas bacterianas (*A. globiformis* D47 y *Variovorax* sp. SRS16) la mineralización de Diurón alcanzó valores de un 61,8% y cuando se mineralizaba sólo con la flora autóctona del suelo la mineralización no resultó ser significativa. En nuestro caso la bioaumentación con las cepas bacterianas degradadoras específicas de Diurón provocó una mejora importante respecto a la atenuación natural de los suelos investigados excepto en el suelo PLD. Los resultados obtenidos en el apartado 4.4.4 en relación a la mineralización observada de Diurón en solución por el consorcio obtenido a partir del suelo PLD (C2) y en la atenuación natural asistida (apartado 4.6.1.1) se obtuvieron resultados de la extensión global de

mineralización mayores (88,6% y 22,3%, respectivamente) que después de la inoculación con el consorcio bacteriano degradador específico estudiado en esta memoria. Esto nos lleva a pensar que en este suelo sí podría existir competencia entre la flora autóctona del suelo y el consorcio bacteriano inoculado. Towell y col. (2011a), observaron que en uno de los tres suelos empleados en su estudio, la extensión global de mineralización de ^{14}C -Pireno alcanzada en el sistema inoculado con un degradador específico resultó ser más baja que la que se obtuvo en ausencia del degradador, concluyendo que se debió a la competencia que existía entre la flora endógena de ese suelo y el degradador específico añadido.

4.6.1.4. Tratamiento mixto. Bioestimulación y bioaumentación en suelos contaminados con Diurón

El objetivo de este experimento fue estudiar la eficacia de un tratamiento mixto a través de una estrategia conjunta basada en la bioestimulación de la flora autóctona del propio suelo mediante la adición de nutrientes (SNs), y la bioaumentación a través de cepas aisladas de degradadores específicos y el incremento de la fracción biodisponible de Diurón en el sistema suelo-agua mediante la adición de HPBCD. Los suelos investigados fueron los 6 empleados en los apartados anteriores (CR, VG, LM, PLD, TM y P44). Este estudio corresponde al tratamiento 26, de la Tabla 2.10.

En la Figura 4.23 se muestran las curvas de mineralización de Diurón en los 6 suelos anteriormente mencionados contaminados con 50 mg kg^{-1} del herbicida, y tratados con los diferentes tratamientos incluyendo el tratamiento mixto. En la Tabla 4.19 también se muestran los datos obtenidos a partir de dichas mineralizaciones (Tratamiento 26). En este estudio, para los 6 suelos la duración de la fase lag fue en todos los casos inferior a 20 días CR: 10 días; VG: 16 días; LM: 2 días; PLD: 13,1 días; TM: 10 días; P44: 15,9 días. Tal como se observa en la Figura 4.23 y en la Tabla 4.19, en general la extensión global de mineralización que se alcanzó en los 6 suelos, CR: 26%; VG: 43,8%; LM: 58%; PLD: 36,5%; TM: 63,9%; P44: 76%, respectivamente, resultó ser mejorada con respecto a los tratamientos aplicados por separado, siendo el suelo P44 donde se alcanzó el mayor porcentaje de mineralización del herbicida al final del experimento. En cuanto al tiempo de vida media, merece la pena destacar la observada en los suelos TM y P44 que resultó ser inferior a 30 días (29 y 28 días, respectivamente), siendo el suelo CR el que presentó un tiempo de vida media mayor (1022 días).

Se puede concluir con los datos obtenidos, que en general, la biodegradación de este herbicida se ve favorecida empleando las dos técnicas de biorrecuperación: bioestimulación y bioaumentación. Otros autores han observado similares resultados.

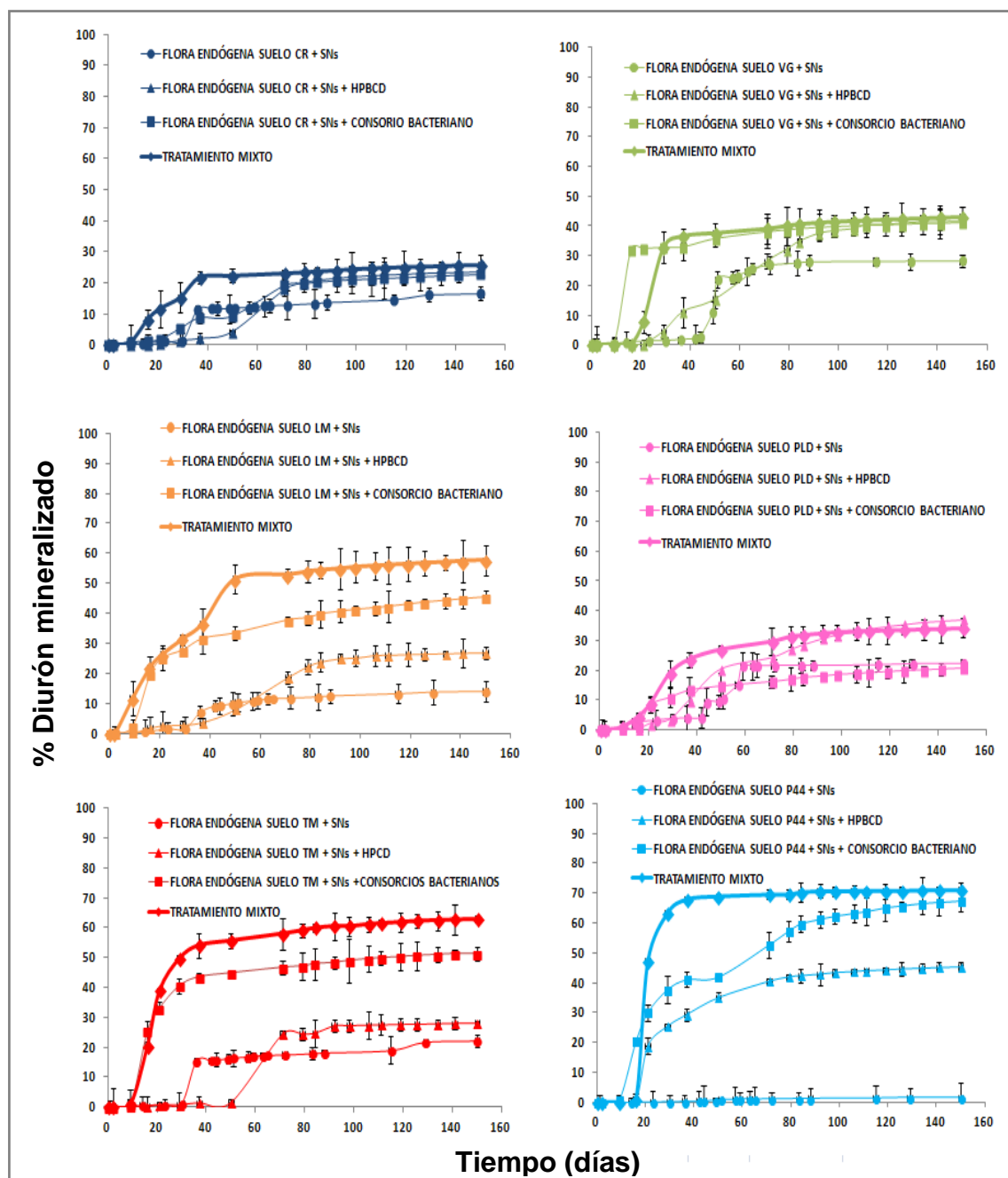


Figura 4.23. Curvas de mineralización de Diurón. Tratamiento mixto.

Garon y col. (2004), obtuvieron mejores resultados en la biorrecuperación de suelos con fluoreno al emplear un hongo (*Absidia cylindrospora*) y un agente quelante, maltosil-ciclodextrina (MCD), la cual hizo más biodisponible al fluoreno y mejoró la biodegradación. Bardi y col. (2000) demostraron como un consorcio bacteriano aislado de un suelo contaminado por petróleo inoculado en suelos pudo acelerar la degradación de dodecano, tetracosano, antraceno y naftaleno con la ayuda de β -ciclodextrina. Villaverde y col. (2012), estudiaron el efecto de la adición de HPBCD x10 en la mineralización de Diurón en un suelo inoculado con una cepa degradadora específica de este herbicida suplementado con SNs. Observaron que el porcentaje

final de Diurón mineralizado en el sistema suplementado con HPBCD x10 alcanzó una extensión global de mineralización del 98,67% y sin HPBCD x10 sólo se mineralizó un 45,25%.

4.6.1.5. Adición de enmiendas orgánicas al suelo CRF contaminado con Diurón. Efecto de la aplicación de HPBCD

El objetivo en este apartado fue comprobar si dos enmiendas orgánicas, LDA y RSU (compost) (Tabla 2.3), podrían ser empleadas en suelos contaminados por Diurón como estimulantes de la biorrecuperación. Para ello se seleccionó un suelo de uso agrícola de los investigados en la presente Tesis, CRF. Este suelo había estado expuesto durante varias décadas a diferentes herbicidas y su flora endógena está capacitada para degradar este herbicida, hecho que se observó al aislar el consorcio degradador específico de Diurón de este suelo a partir de un medio enriquecido con el herbicida, además de comprobarse la capacidad de mineralización en medio líquido sin suelo (apartado 4.4.4) donde se alcanzó un 64,6%, aunque la extensión global de este suelo en presencia de nutrientes esenciales (ANA), no fue alta (15,5%) respecto a otros, como se ha comprobado en el apartado anterior 4.6.1.1 de estos Resultados. Por ello, para mejorar la biorrecuperación de este suelo se emplearán dichas enmiendas orgánicas (LDA y RSU). Ellegaard-Jensen y col. (2013) mostraron que la degradación del herbicida Diurón resultó ser más rápida en presencia de medios ricos en nitrógeno y fuente de carbono. Otros autores como Tejada y col. (2010) y Teng y col. (2010), afirman que el aumento de la biorrecuperación se puede lograr ajustando el contenido de nutrientes del suelo contaminado.

Las curvas de mineralización en el suelo seleccionado en presencia de ambos compost y a diferentes concentraciones 0,5%, 2% y 4%, se muestran en la Figura 4.24. Estas mineralizaciones corresponden a los tratamientos 27 y 28 (Tabla 2.10). Todas las mineralizaciones en presencia de estas enmiendas se ajustaron al modelo cinético simple de primer orden (SFO) (Tabla 4.20).

Al aplicar ambas enmiendas al 0,5%, la extensión global de mineralización (13,9, 13,4%, para LDA y RSU, respectivamente) resultó ser incluso menor que la sola aplicación de los SNs (15,5%). En cambio, aparece un incremento en la extensión global de mineralización cuando ambas enmiendas se aplicaron a concentraciones más altas, al 2%, LDA: 24,48% y RSU: 14,57%, y al 4%, LDA: 32,92% y RSU: 33,05%.

La fase lag y la DT_{50} para ambas enmiendas fueron disminuyendo a medida que se aplicaron mayores concentraciones de las mismas. La fase lag para la enmienda LDA a 0,5%, 2% y 4% fue de 60, 27 y 18 días, respectivamente y la fase lag para la enmienda RSU a 0,5%, 2% y 4% fue de 54, 49 y 18 días, respectivamente. Los valores observados de DT_{50} fueron para la enmienda LDA a 0,5%, 2% y 4% de 804, 360 y 240 días, respectivamente y, para la enmienda RSU a 0,5%, 2% y 4%

en 734, 660 y 244 días, respectivamente, valores todos ellos por debajo del obtenido solo con nutrientes (6297 días). Prácticamente para ambas enmiendas al 4%, la DT_{50} se alcanzó al mismo tiempo (240 días), en un tiempo 26 veces menor que cuando se aplica sólo la SNs al suelo (Tabla 4.20).

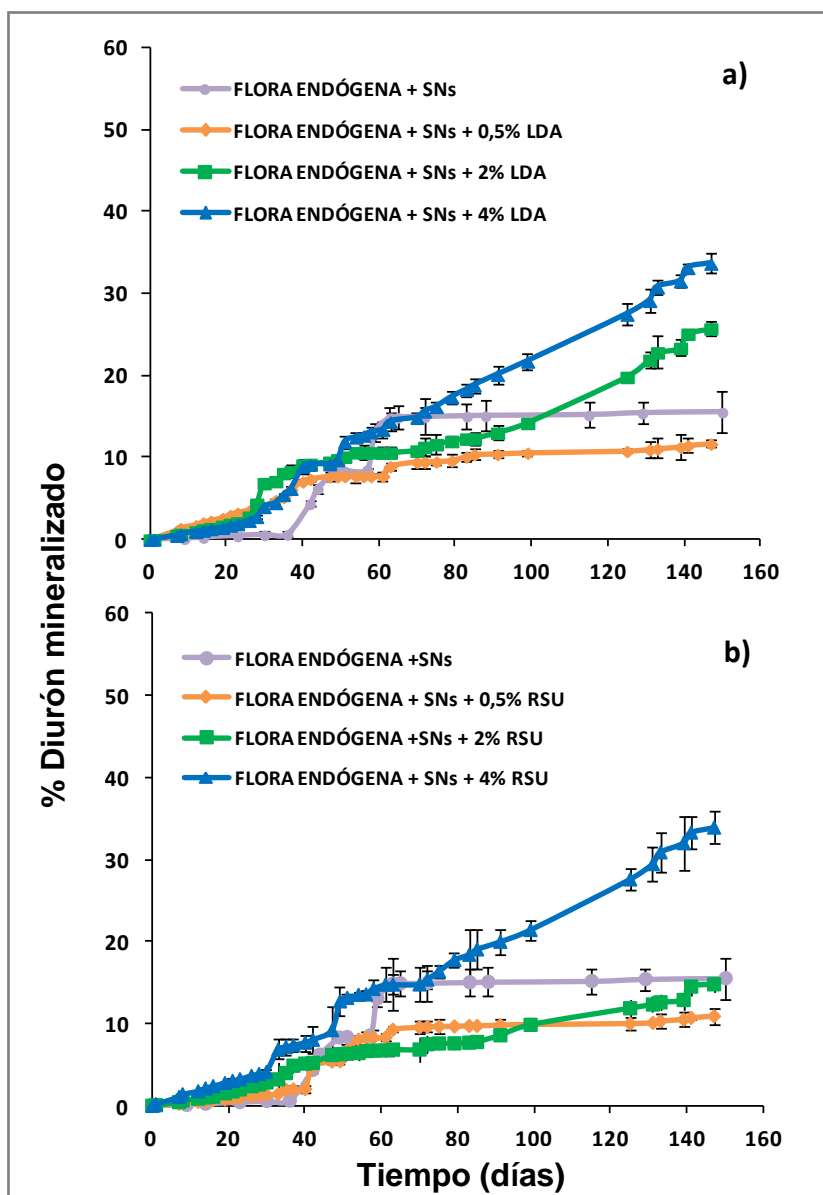


Figura 4.24. Curvas de mineralización del herbicida Diurón en el suelo CRF en presencia de nutrientes (SNs) (●) y la posterior adición de: **a)** compost LDA y **b)** compost RSU aplicados a diferentes concentraciones (0,5% (◆), 2% (■) y 4% (▲)).

A la vista de estos resultados, se observa claramente que la aplicación de estos compost provocaría mejoras significativas en la mineralización del herbicida tanto desde un punto de vista cuantitativo, aumentándose la cantidad global mineralizado, como cinético consiguiéndose una reducción de la fase lag y de la DT_{50} , siendo este último punto de vital importancia a la hora de tomar la decisión de aplicar una estrategia de biorrecuperación *in situ* de un suelo contaminado.

La adición de MO exógena mejora las propiedades biológicas, físicas, químicas y de fertilidad de los suelos (Thevenot y col. 2008) y por lo tanto influirán en la biodegradación, retención y transporte de herbicidas en suelos (López-Piñero y col. 2013; Herrero-Hernández y col. 2011; Romero y col. 2010). Otros trabajos publicados, en cambio, han descrito un efecto de retención-secuestro del contaminante provocando una disminución de la biodisponibilidad del herbicida (Wauchope y col. 2002; Puglisi y col. 2007; Tejada y col. 2011). Barriuso y col. (1997), mostraron que aunque en general la adición de compost favorece la estabilización de los residuos de herbicidas, este efecto dependerá del tipo de enmienda orgánica. Wu y col. (2014) demostraron que las enmiendas orgánicas pueden eliminar la fracción recalcitrante de PAHs en suelos.

Tabla 4.20. Datos obtenidos a partir de las mineralizaciones de Diurón en el suelo CRF dopado con 50 mg kg⁻¹ y en presencia de 2 enmiendas orgánicas (RSU y LDA), y en ausencia y en presencia de HPBCD.

Tratamientos	Modelo cinético	K ₁ (día ⁻¹)	K ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
CRF + SNs	HS	5,1 10 ⁻³	0,9 10 ⁻⁴	68,0	39	6297	15,5
CRF + SNs + 0,5% LDA	SFO	8,6 10 ⁻⁴	-	-	60	804	13,9
CRF + SNs + 2% LDA	SFO	2,0 10 ⁻³	-	-	27	360	24,5
CRF + SNs + 4% LDA	SFO	3,0 10 ⁻³	-	-	18	240	32,9
CRF + SNs + 0,5% RSU	SFO	9,5 10 ⁻⁴	-	-	54	734	13,4
CRF + SNs + 2% RSU	SFO	1,2 10 ⁻³	-	-	49	660	14,6
CRF + SNs + 4% RSU	SFO	3,0 10 ⁻³	-	-	18	244	33,1
CRF + SNs + HPBCDx10	HS	2,6 10 ⁻²	4,0 10 ⁻⁴	42,2	33	1778	29,7
CRF + SNs + HPBCDx10 + 4% LDA	HS	2,0 10 ⁻²	3,0 10 ⁻³	21,4	11	174	46,5
CRF + SNs + HPBCDx10 + 4% RSU	HS	2,5 10 ⁻²	3,6 10 ⁻⁴	40,2	16	1606	33,2

SFO: Modelo cinético simple de primer orden; HS: Modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick.

k₁: constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k₂: constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

La materia orgánica disuelta (MOD) exógena o endógena podría influir en el transporte de herbicidas, a través de la formación de un complejo MOD-herbicida y/o por competencia entre la MOD y el herbicida por puntos de adsorción del suelo, lo que también provocaría un incremento en su biodisponibilidad (Williams y col. 2002). Para confirmar este punto, se analizó la concentración de Diurón presente en la solución en experimentos paralelos empleando las mismas condiciones que en los ensayos de mineralización (50 mg kg⁻¹ de Diurón) con las dos

enmiendas orgánicas al 4% (Figura 4.25), concentración a la cual se obtuvieron los mejores resultados de mineralización (Figura 4.24). La concentración de la MOD en los experimentos con composts fue muy diferente (0,7 y 0,1 g kg⁻¹ para RSU y SS, respectivamente), pero sin embargo, este factor no influyó en las extracciones realizadas en presencia de las enmiendas al 4%. Cuando en el suelo sólo estuvieron presentes los nutrientes (SNs), se extrajo un 0,96% de Diurón, pero al aplicar las dos enmiendas orgánicas este porcentaje fue mayor aunque muy parecido entre ambas 4,47% y 4,45% para LDA y RSU, respectivamente. Estos resultados ponen de manifiesto la cantidad que hay de Diurón biodisponible, siendo muy parecido al aplicar las dos enmiendas al 4%, y corroborando que la extensión máxima de mineralización sea prácticamente igual en ambas (32,9% y 33,1%, LDA y RSU, respectivamente) y el doble de la cantidad mineralizada sólo en presencia de la solución de nutrientes (15,5%). Este incremento podría ser debido a la formación del complejo MOD-Diurón como ha sido observado por otros autores (Thevenot y col. 2008; Cox y col. 2004; El Imache y col. 2012). Aunque LDA y RSU aportan de diferentes MOD (0,28 y 0,04 mg MOD/g de suelo, respectivamente) la similar extracción obtenida indica que el tipo de MOD aplicado juega un papel importante en la biodisponibilidad del herbicida. Es decir, la formación de MOD-Diurón sólo no explica la significativa disminución del DT₅₀ en las mineralizaciones con enmiendas orgánicas, en las que se dividió por 26 después de una aplicación de un 4% de ambos compost (Tabla 4.20).

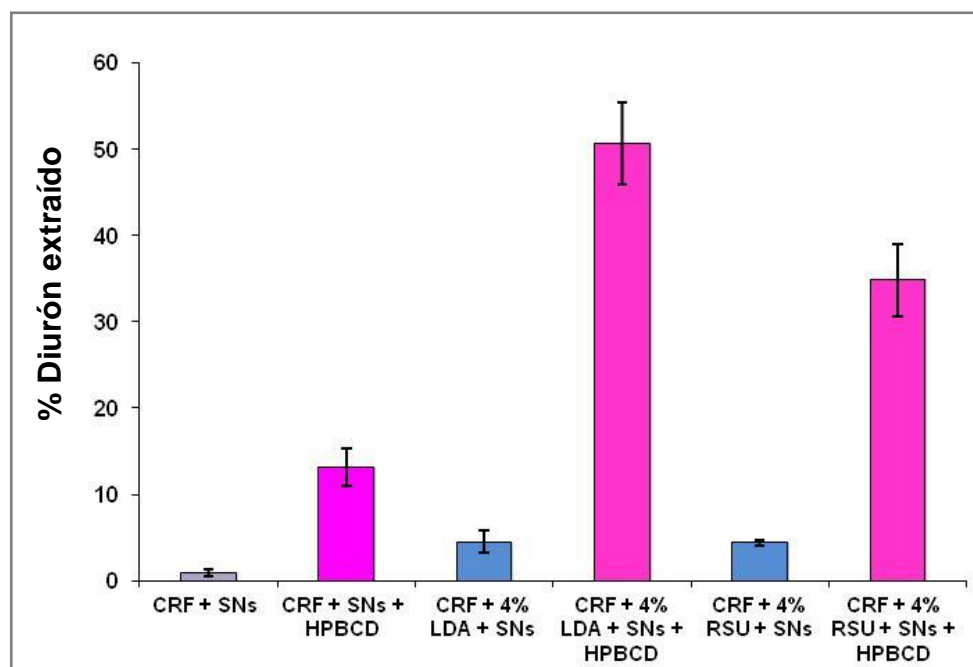


Figura 4.25. Porcentaje de Diurón extraído en el suelo CRF en presencia de la SNs, y/o las dos enmiendas, LDA y RSU al 4% con y sin HPBCD x10.

Otra explicación a nuestros resultados sería que las enmiendas orgánicas estén suministrando nutrientes al suelo (Tabla 2.3), actuando de esta forma como bioestimulantes de la flora endógena del mismo y, provocando un efecto similar al observado cuando se aplica la SNs, favoreciendo la biodegradación por el aporte de éstos. Por lo tanto, la aplicación de estas enmiendas podría aportar una doble función a los suelos agrícolas, es decir, LDA y RSU podrían ser empleadas para fines agrícolas recuperando la calidad del suelo y sus funciones biológicas, físicas y químicas (Martínez-Blanco y col. 2013; Wang y col. 2013), así como acelerando la eliminación del herbicida Diurón una vez éste haya llevado su acción biológica. Doan y col. (2014) demostraron que la fertilización orgánica mejora las propiedades del suelo y, en consecuencia aumenta la población bacteriana favoreciendo la capacidad de reproducción genética. Por otro lado, según Barriuso y col. (1997) los microorganismos y la MO humificada que existen en las enmiendas orgánicas mejoraran la ANA del propio suelo. Wischmann y Steinhart (1997), mostraron que la administración de suplementos con materiales de compost a suelos contaminados podría mejorar la biodegradación de PAHs sin acumulación a largo plazo de los intermediarios polares y por tanto ser más biodisponibles. Por tanto, se puede decir en este apartado que la naturaleza de la enmienda orgánica tiene consecuencias importantes sobre el suelo y en la abundancia microbiana, sin embargo, el compost también contiene materia orgánica humificada, la cual puede ser más o menos recalcitrante, es decir, la cantidad de C añadido puede aumentar la MO del suelo, pero no ayudar directamente a los microorganismos a prosperar.

Por otro lado, el compost puede actuar como un mejorador del suelo capaz de favorecer el entorno del suelo contaminado mediante la introducción de una flora microbiana con actividad degradadora (Semple y col. 2001). En nuestro caso, se observaron microorganismos potencialmente degradadores específicos (Tabla 2.3), tanto en el suelo seleccionado como en el compost. Se aprecia un alto valor de UFC en las dos enmiendas orgánicas (LDA: 68×10^5 UFC g⁻¹ y RSU: 23×10^5 UFC g⁻¹) con respecto al suelo CRF (81×10^3 UFC g⁻¹).

De todo lo comentado en el presente apartado se podría concluir que la mejora en la tasa de mineralización de Diurón después de la aplicación de ambas enmiendas se debió principalmente a varios factores: I) el suministro de microorganismos degradadores de Diurón específicos presentes en las enmiendas orgánicas; II) la presencia de nutrientes orgánicos lábiles provenientes de la MO de los compost utilizados como fuente de carbono; III) la MOD que actúa como extractante natural aumentando la concentración de Diurón en la solución del suelo.

Efecto de la adición de HPBCD en los experimentos de mineralización de Diurón en el suelo CRF

Las experiencias para estudiar el efecto de la adición de HPBCD en la mineralización se han llevado a cabo con el objetivo de comprobar si HPBCD es capaz de hacer más biodisponible al herbicida Diurón disminuyendo así su fase lag y observar cambios significativos en la extensión máxima mineralizada en el tratamiento conjunto con las enmiendas orgánicas estudiadas y HPBCD.

Las curvas de mineralización en el suelo seleccionado en presencia de HPBCD y en el tratamiento conjunto de HPBCD con las enmiendas orgánicas se muestran en la Figura 4.26.

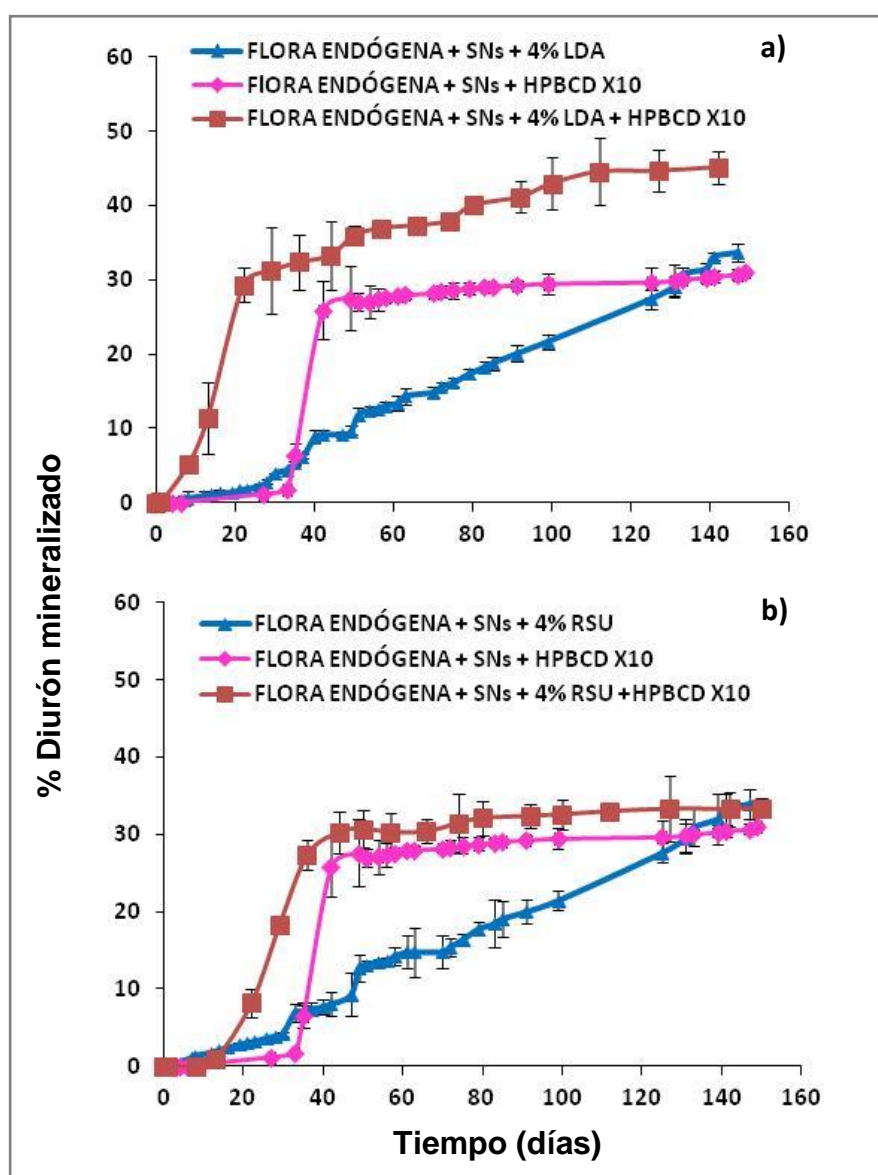


Figura 4.26. Curvas de mineralización del herbicida Diurón en el suelo CRF en presencia de las dos enmiendas orgánicas: **a)** SNs y 4% LDA (\blacktriangle); SNs y la adición de HPBCD (\blacklozenge); SNs, 4% LDA y la adición de HPBCD (\blacksquare). **b)** SNs y 4% RSU (\blacktriangle); SNs y la adición de HPBCD (\blacklozenge); SNs, 4% RSU y la adición de HPBCD (\blacksquare).

Estas mineralizaciones corresponden a los tratamientos 24, 29 y 30 (Tabla 2.10). Todas las mineralizaciones en presencia de estas enmiendas se ajustaron al modelo cinético de primer orden bifásica, Hockey-Stick (HS) (Tabla 4.20).

En primer lugar, observando los parámetros cinéticos (Tabla 4.20) cuando sólo se adiciona al suelo la solución de HPBCD se observa una mayor extensión global de mineralización (29,7%) al compararla con la aplicación sólo de los SNs (15,5%) y con las curvas de mineralización de las dos enmiendas orgánicas al 4% empleadas, LDA (Figura 4.26a) y RSU (Figura 4.26b), con extensión global de mineralización de 32,9 y 33,1%, respectivamente. Sin embargo, la fase lag y el valor de DT_{50} no mejora al usar sólo HPBCD en comparación con el uso de las dos enmiendas. Como ya se ha comentado en anteriores apartados de esta memoria y corroborado por literatura actual (Morillo y col. 2012, Sánchez-Trujillo y col. 2013), la CD empleada en este trabajo forma complejos de inclusión con el herbicida Diurón (Villaverde y col. 2012, 2013a) aumentando su biodisponibilidad en solución, y por tanto, se alcanza una mayor extensión global mineralización como se observa en la Tabla 4.20.

También se analizó la concentración de Diurón presente en la solución en ensayos paralelos con las mismas condiciones que los ensayos de mineralización (50 mg kg^{-1} de Diurón) con HPBCD (Figura 4.25). Cuando en el suelo estuvieron presentes los nutrientes (SNs) y HPBCD, estos provocaron un importante incremento de la fracción del herbicida desorbido (14,7%) ya que al emplear sólo la solución de nutrientes y, éstos con las dos enmiendas orgánicas, LDA y RSU, los valores de extracción resultaron menores (0,96, 4,47 y 4,45%, respectivamente) (Figura 4.25). Semple y col. (2007) afirmaron que la extracción con HPBCD es capaz de hacer más biodisponible a PAHs y que la CD es capaz de predecir la biodegradación de contaminantes orgánicos en condiciones de laboratorio.

Se podría resumir que el papel de HPBCD como potenciador de la biodisponibilidad de Diurón y, como consecuencia, aumentador de la mineralización, podría ser debido a dos efectos diferentes: a) formación de un complejo de inclusión en solución y b) HPBCD podría ser utilizada como fuente de carbono por los microorganismos autóctonos del suelo y promover su crecimiento. Esta última hipótesis se ha demostrado no ser válida, ya que se realizaron estudios paralelos con este suelo y con las dos enmiendas orgánicas en placa-Petri con y sin HPBCD obteniendo para los dos compost, que el crecimiento de los microorganismos era el mismo, es decir, HPBCD no era utilizada como fuente de carbono por la flora autóctona de dicho suelo y de las enmiendas. De nuevo, se vuelve a corroborar el efecto de la aplicación de HPBCD explicados en los apartados 4.5 y 4.6.1.2 de éstos Resultados.

Efecto conjunto de la adición de HPBCD y las enmiendas orgánicas en los experimentos de mineralización de Diurón en el suelo CRF

Volviendo de nuevo a la Figura 4.26 a y b y a la Tabla 4.20, se observa el estudio conjunto entre la adición de HPBCD y ambas enmiendas orgánicas al 4% en el suelo CRF. Es destacable la forma de la curva de mineralización para ambas enmiendas orgánicas, donde se aprecian claramente las rápidas cinéticas de mineralización del herbicida, reduciéndose así la fase lag en ambas enmiendas (11 y 16 días para LDA y RSU, respectivamente) respecto a los anteriores tratamientos que se han comentado (Tabla 4.20), y alcanzándose la DT_{50} en sólo 174 días en el caso del tratamiento conjunto con LDA y 1606 días con la enmienda orgánica RSU.

La aplicación conjunta de HPBCD y RSU da lugar a parámetros cinéticos no tan buenos como los datos obtenidos con la enmienda orgánica LDA. Este resultado se confirma porque en la extracción de Diurón realizada (Figura 4.25) en las mismas condiciones que los estudios de mineralización, los porcentajes extraídos fueron 50,7% y 34,8% para LDA y RSU, respectivamente. A pesar de ello la adición conjunta de ambas enmiendas junto con HPBCD da mejores parámetros cinéticos que por separados. Es decir, estos resultados vuelven a corroborar que cuando HPBCD está presente en solución es capaz de incrementar la fracción biodisponible de este herbicida, e incrementa dicha fracción en solución en ambos tratamientos con las enmiendas orgánicas, pero sobre todo con la enmienda orgánica LDA (Figura 4.25). El hecho de que el compost RSU posea un contenido de MO más de 3,5 veces mayor que el de LDA podría ser la razón de un menor aumento tanto en la extracción como en la mineralización de Diurón en presencia de HPBCD, como consecuencia de una mayor adsorción Diurón en RSU que en LDA. Como se ha comentado previamente, la HPBCD es capaz de extraer la fracción potencialmente biodisponible de Diurón, y por lo tanto ésta será inferior en el suelo modificado con el compost con un contenido de MO superior (RSU).

De estos resultados se puede concluir que al aumentar el porcentaje de la fracción biodisponible de Diurón también se incrementó la extensión global de mineralización, lo que podría ser debido al efecto combinado de la MOD y la formación del complejo de inclusión entre HPBCD y Diurón. Yu y col. (2011) observaron un efecto similar de MOD y un biotensioactivo en la desorción de PAHs, concluyendo que la combinación sinérgica provocaba un aumento en la superficie hidrófoba del complejo MOD-biotensioactivo y se extraía con mayor facilidad (Nkambule y col. 2009). Polubesova y col. (2007) llevaron a cabo experimentos para determinar el efecto de la formación de complejos de pireno con metales polivalentes (Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+}) extraídos de los lodos de depuradora, observándose que la presencia de estos inducen a pseudomicelas y se obtiene en solución mayor cantidad de MOD que cuando está sólo presente dicho PAHs. Aunque, la

enmienda orgánica LDA ofrecería limitaciones en su aplicación para el uso agrícola, debido a su elevado contenido en metales pesados (BOE Real Decreto 824/2005, anexo V), recibiendo la clasificación de enmienda tipo C (apartado 3.1.5, de Materiales y Métodos), estaría más indicada en escenarios con suelos que presentan una contaminación puntual, como la investigada en este apartado.

Es importante destacar de este apartado las ventajas del uso de CDs para la descontaminación del suelo, siendo compuestos biodegradables (Gould y Scott, 2005) en el medio ambiente y la viabilidad de su uso en relación con el precio del producto como técnica de recuperación (Gruiz y col. 2010). Además, esta estrategia de biorrecuperación de suelos que se presenta en este apartado, con tratamientos conjuntos entre enmiendas orgánicas (RSU y LDA) e inorgánicas (SNs), agentes complejantes (HPBCD) y la flora endógena presente en el suelo y en dichas enmiendas resulta ser un tratamiento muy favorable para la recuperación de suelos contaminados por Diurón.

4.6.2. Experimentos con suelos en estático. Aproximación a un escenario real

Una vez que se ha estudiado el efecto de diferentes estrategias para acelerar la biorrecuperación por la propia flora autóctona de los suelos investigados (atenuación natural asistida) en sistemas en suspensión (suelos/solución = 10g/50mL), en este apartado se realizaron ensayos similares de mineralización pero en suelos con una humedad del 40% de capacidad de campo y en estático, situación más cercana a la realidad. En este ensayo se seleccionó sólo el suelo AL (Tabla 2.10). Se trata de un suelo agrícola, con un alto contenido en MO (2,13%), en el cual los ensayos de mineralización en suspensión, y en la sola presencia de la solución de nutrientes (SNs), se obtuvieron los mejores resultados en los parámetros cinéticos de mineralización (extensión global de mineralización 95,6%; fase lag 13,6 días; DT_{50} 18,3 días; constantes de mineralización $k_1 = 1,5 \cdot 10^{-1}$; $k_2 = 1,7 \cdot 10^{-2}$; $t_b = 19,4$) (Tabla 4.17). Por tanto, no fue necesario emplear otros tratamientos de bioestimulación y/o bioaumentación en los experimentos con este suelo en suspensión y con agitación continua para mejorar estos parámetros.

En la Figura 4.27 se representa la curva de mineralización de Diurón en sistemas estáticos, en 4 tratamientos diferentes contaminado a 50 mg kg^{-1} , que correspondería a los tratamientos 31, 32, 33 y 34 de la Tabla 2.10: Tratamiento 31: Flora endógena suelo AL + SNs; Tratamiento 32: Flora endógena suelo AL+ SNs +HPBCD; Tratamiento 33: Flora endógena suelo AL+ SNs + Consorcio bacteriano; Tratamiento 34: Flora endógena suelo AL + SNs + Consorcio bacteriano + HPBCD. En la Tabla 4.21 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos en estos estudios de mineralización. Todas las mineralizaciones se ajustaron a un modelo cinético de primer orden

bifásico, Hockey-Stick (HS), excepto la mineralización del Tratamiento 31, que se ajustó al modelo de cinética de primer orden simple (SFO).

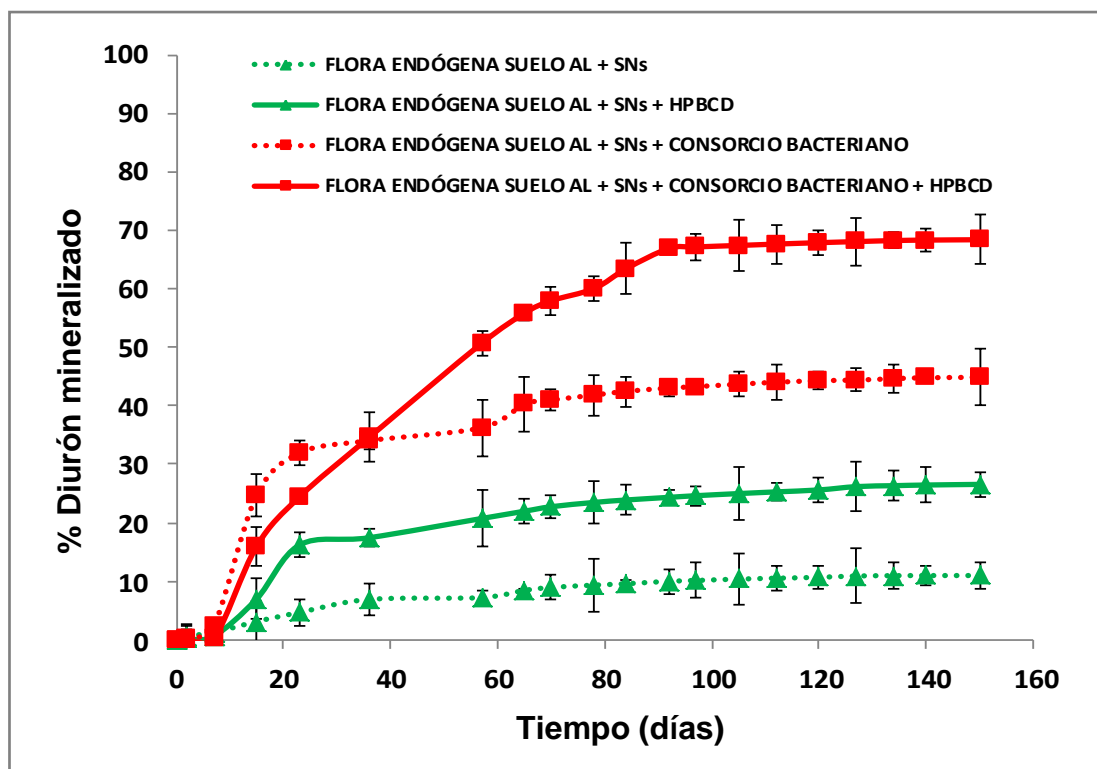


Figura 4.27. Curvas de mineralización de Diurón en el suelo AL en condiciones estáticas al 40% de la capacidad de campo tras 4 tratamientos diferentes.

Tabla 4.21. Parámetros cinéticos de las mineralizaciones de Diurón en el suelo AL dopados con 50 mg kg^{-1} en 4 tratamientos diferentes en estático.

Suelos y Tratamientos*	Modelo cinético	K_1 (día ⁻¹)	K_2 (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
31	SFO	$8,0 \cdot 10^{-4}$	-	-	8,4	881	13,1
32	HS	$5,4 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	35,6	10,0	745	27,3
33	HS	$3,3 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$	18,2	6,3	196	47,1
34	HS	$1,3 \cdot 10^{-2}$	$8,3 \cdot 10^{-4}$	88,6	7,0	60	68,6

(*) Tratamiento 31: Flora endógena suelo AL + SNs.

Tratamiento 32: Flora endógena suelo AL + SNs + HPBCD x10.

Tratamiento 33: Flora endógena suelo AL + SNs + Consorcio bacteriano.

Tratamiento 34: Flora endógena suelo AL + SNs + Consorcio bacteriano + HPBCD x10.

SFO: Modelo cinético simple de primer orden; HS: Modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick.

k_1 : constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k_2 : constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

Cuando al suelo AL se le adicionó sólo la SNs (Tratamiento 31) en condiciones estáticas, la extensión global de mineralización fue del 13,1% (Tabla 4.21). Comparando este resultado con el ensayo realizado en un sistema en suspensión continua, la extensión global fue 95,6% (Tabla 4.21). Fue entonces, necesario en este sistema estático aplicar los diferentes tratamientos de biorrecuperación y comprobar además si eran efectivos estos tratamientos en condiciones estáticas.

La duración de la fase lag en los Tratamientos 31, 32, 33 y 34 fue muy similar: 8,4, 10,0, 6,3 y 7,0 días, respectivamente (Tabla 4.21). Tal como se observa en la Figura 4.27 y en la Tabla 4.21, sin embargo, la extensión global de mineralización de Diurón que se alcanzó para el suelo AL resultó ser distinta para los diferentes tratamientos: tratamiento 31, 13,1%; tratamiento 32, 27,3%; tratamiento 33, 47,1%; tratamiento 34, 68,6%, siendo en este último tratamiento en el que se alcanzó el mayor porcentaje de mineralización del herbicida al final del experimento. En cuanto al tiempo de vida media resultó ir disminuyendo en el orden: Tratamiento 31 > 32 > 33 > 34. En el Tratamiento 34 se alcanzó el 50% de mineralización del herbicida tan solo en 60 días.

Los resultados obtenidos son datos lógicos, porque en un sistema dinámico el suelo está más disgregado y el herbicida se encuentra más biodisponible, en cambio, en un sistema estático y con un contenido de agua de sólo el 40% de la capacidad de campo, el herbicida está más fuertemente atrapado y, por tanto es más difícil que los microorganismos sean capaces de llegar a incorporar este herbicida para biodegradarlo. Por tanto los mecanismos de difusión del contaminante hacia la solución están más favorecidos en un sistema dinámico que en un sistema estático, en el que es más difícil su accesibilidad por parte de los microorganismos presentes (Semple y col. 2003; Ehlers y Loibner, 2006).

En conclusión, es necesaria la aplicación de otros tratamientos en un sistema estático, como HPBCD para conseguir un incremento en la fracción biodisponible del herbicida y una bioaumentación de la cantidad de biomasa degradadora específica en el suelo, la cual provocará un adecuado incremento en la tasa de mineralización del herbicida.

Por último, dentro de este apartado, se ha realizado además, un estudio aplicando un consorcio aislado previamente del suelo CRF (C1), del cual se observó su comportamiento en medio líquido en el apartado 4.4.4 de esta memoria y, además el efecto que produciría al aplicar HPBCD. En la Figura 4.28 se representan las curvas de mineralización de Diurón obtenidas tras la aplicación del consorcio C1 y HPBCD al suelo AL en estático (Tratamientos 35 y 36, respectivamente). En la Tabla 4.22 se muestran los parámetros cinéticos obtenidos en estos estudios de mineralización. Las mineralizaciones se ajustaron a un modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick (HS).

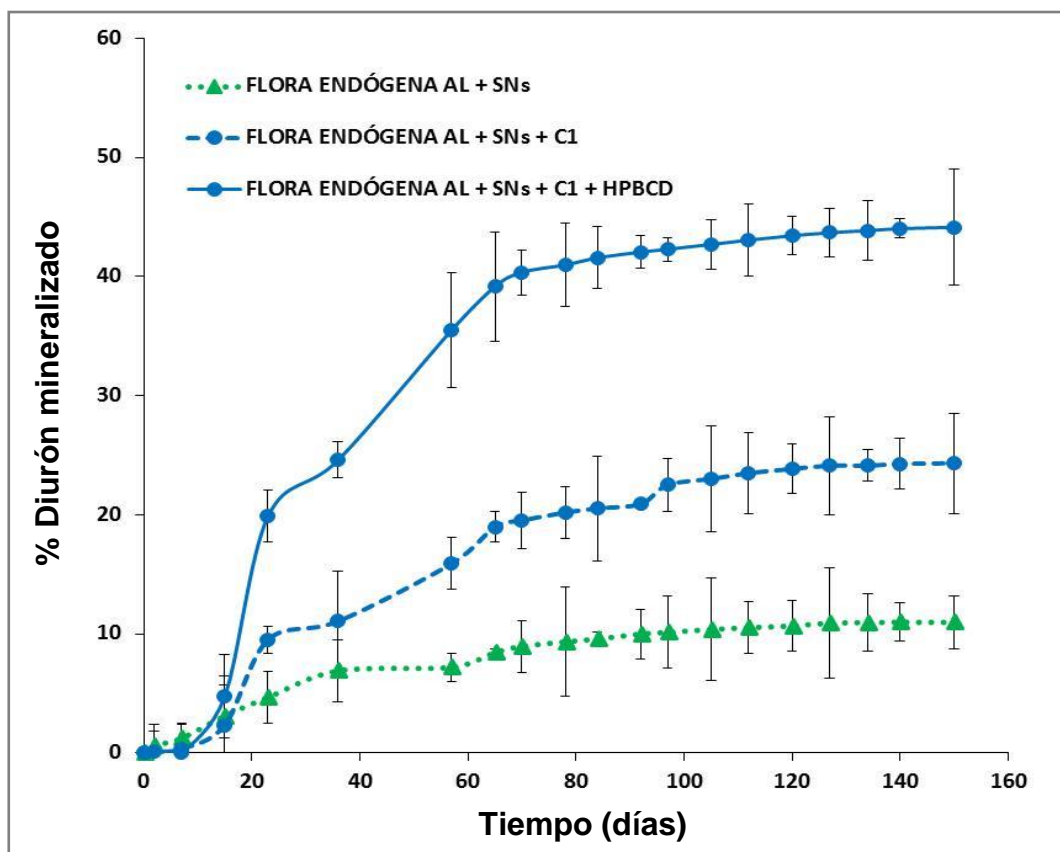


Figura 4.28. Curvas de mineralización de Diurón en el suelo AL en condiciones estáticas al 40% de la capacidad de campo tras 3 tratamientos diferentes.

Tabla 4.22. Parámetros cinéticos de las mineralizaciones de Diurón en el suelo AL dopados con 50 mg kg⁻¹ en 3 tratamientos diferentes en estático.

Suelos y Tratamientos*	Modelo cinético	K ₁ (día ⁻¹)	K ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
31	SFO	8,0 10 ⁻⁴	-	-	8,4	881	13,1
35	HS	3,4 10 ⁻³	4,6 10 ⁻⁴	60,4	15	355	23,2
36	HS	0,8 10 ⁻³	6,2 10 ⁻³	63,2	12	214	42,2

(*) Tratamiento 31: Flora endógena suelo AL + SNs.

Tratamiento 35: Flora endógena suelo AL en estático + SNs + C1.

Tratamiento 36: Flora endógena suelo AL en estático + SNs + C1 + HPBCD.

SFO: Modelo cinético simple de primer orden; HS: Modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick.

k₁: constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k₂: constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

En la Tabla 4.22 se observan los parámetros de las cinéticas obtenidos en estos suelos estudiados: K_1 , K_2 , t_b , la fase lag, DT_{50} , y la extensión global de mineralización. Al añadir a la microbiología del suelo AL un consorcio aislado de otro suelo (CRF) el comienzo de la mineralización incluso se realiza en mayor tiempo (fase lag 15 días) que en ausencia del consorcio C1 (8,4 días), pudiendo existir una lucha entre ambos consorcios por el herbicida Diurón, influyendo esto en la fase lag de la mineralización. Goldtein y col. (1985), también observaron que existía una competencia entre las bacterias endógenas de los suelos y la flora exógena que utilizaron en sus experimentos. El Fantroussi y Agathos, (2005) observaron que existía competencia y disminuían los nutrientes de manera más rápida cuando se bioaumentaban con flora exógena. Sin embargo, al transcurrir el tiempo el DT_{50} y la extensión global de mineralización mejoran.

Al añadir HPBCD al sistema (Tratamiento 36) junto con el consorcio C1 la mineralización alcanzada es del 42,2%, un 82% mayor que sin la adición de este agente complejante (Figura 4.28, Tabla 4.22). Friendrich y col. (2000) y Grosser y col. (2000), demostraron claramente la importancia de emplear técnicas y condiciones de enriquecimiento simulando condiciones reales para obtener mejores resultados de biodegradación. Además, Giacomazzi y col. (2004) concluyeron la importancia que tiene estudiar degradadores potencialmente específicos del herbicida Diurón, para reducir la persistencia de este herbicida en el menor tiempo posible. Esto confirma nuestros resultados, ya que con el consorcio formado por las tres cepas bacterias *A. sulfonivorans*, *V. soli* y *A. kashmirensis* (Figura 4.27) los parámetros cinéticos obtenidos resultan ser mejores que al añadir al sistema un consorcio aislado (consorcio C1), el cual aunque presenta degradadores específicos de Diurón, todavía no se ha estudiado que especies están presentes ni la ruta metabólica que emplean.

4.7. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE DIURÓN EN SUELOS CONTAMINADOS Y ENVEJECIDOS

Actualmente, existe un interés científico en encontrar técnicas analíticas capaces de predecir la biodisponibilidad a largo plazo de residuos de compuestos orgánicos contaminantes. Los análisis químicos deben ir acompañados de pruebas biológicas con el fin de obtener información adicional sobre la biodisponibilidad, biodegradabilidad, los efectos adversos de los contaminantes y la conducta adaptativa de los microorganismos presentes (Molnár y col. 2009). La norma ISO 17402:2011 considera una evaluación adecuada de la biodisponibilidad cuando los datos químicos están correlacionados con los resultados de las pruebas biológicas. Además, la precisión y sensibilidad, así como el tiempo y los costes de ensayos químicos y biológicos, deben coincidir.

Numerosas técnicas químicas se han investigado y testado con el objetivo de estimar la biodisponibilidad de un compuesto tóxico (Cuypers y col. 2002; Doick y col. 2005; Mordaunt y col. 2005; Reichenberg y Mayer, 2006; Rhodes y col. 2008). La mayoría de los estudios han preferido el uso de diferentes técnicas de extracción, las cuales han sido divididas en exhaustivas y no exhaustivas. Las técnicas exhaustivas ofrecen una sobreestimación de la toxicidad real, tanto en laboratorio como en estudios de campo, ya que todo el contaminante es extraído y no sólo la fracción que realmente es biodisponible (Papadopoulos y col. 2007; Hofman y col. 2008; Rhodes y col. 2008). Diferentes técnicas exhaustivas de extracción han sido desarrolladas y empleadas convencionalmente usando soxhlets (Villaverde y col. 2008), ultrasonidos (Petrovic y col. 2005) o EAD (extracción acelerada con disolvente) empleando diferentes disolventes orgánicos como diclorometano, hexano, tolueno, etc. Por el contrario, las extracciones no exhaustivas pretenden extraer solo la fracción bioaccesible del contaminante (disuelta y/o rápidamente desorbible). Las técnicas no exhaustivas suelen ser técnicas de extracción acuosas, ej: utilizando agua destilada, soluciones de cloruro cálcico y más recientemente soluciones de ciclodextrinas (CDs) (Reid y col. 2000).

Basándose en estas premisas, en este apartado el objetivo que se plantea será desarrollar una técnica rápida y eficaz en suelos contaminados a través del análisis de las correlaciones obtenidas entre la cantidad de Diurón extraída, empleando diferentes extractantes no exhaustivos con el fin de evaluar su biodisponibilidad a diferentes tiempos de envejecimiento, y la cantidad del herbicida que es mineralizado en presencia de microorganismos degradadores específicos. En los suelos envejecidos, sobre todo, la biorrecuperación está fuertemente limitada por numerosos factores, destacando la menor biodisponibilidad y biodegradabilidad de los contaminantes (Molnár y col., 2009; Lladó y col. 2013; Ortega-Calvo y col. 2013).

4.7.1. Efecto del envejecimiento en la mineralización de Diurón en suelos seleccionados

Inicialmente se evaluará el efecto del envejecimiento sobre la mineralización de Diurón en los 10 suelos estudiados en esta memoria con diferentes propiedades físico-químicas. Por tanto, una vez que se ha comprobado que el consorcio bacteriano (*A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. soli*) consigue mineralizar al herbicida Diurón en medio líquido, en suelos en suspensión y en suelos en sistema estático, para este estudio se emplearon todos los suelos con el objetivo de estudiar el efecto del envejecimiento del contaminante en la mineralización mediante la inoculación de dicho consorcio bacteriano degradador específico para Diurón. Para ello, se doparon los suelos con el herbicida (50 mg kg^{-1}) y se dejaron envejecer durante distintos periodos de tiempo de 15, 30, 60 y 100 días, tal como se describe en Materiales y Métodos (Tabla 2.10, Tratamiento 21). Con el objetivo de evitar que hubiera pérdidas debidas a la degradación

microbiana del herbicida en los suelos durante su envejecimiento éstos fueron autoclavados e inmediatamente cerrados herméticamente durante los distintos tiempos. Con ello se aseguraba que la totalidad de Diurón agregado estaba presente al inicio del proceso de mineralización.

En la Figura 4.29 se representa el efecto del envejecimiento en la mineralización de Diurón en los 10 suelos inoculados con el consorcio bacteriano y en presencia de nutrientes (SNs). En la Tabla 4.23a y b se muestran los parámetros cinéticos obtenidos a partir de estas curvas de mineralización de ^{14}C -Diurón, las cuales fueron ajustadas y modelizadas siguiendo las recomendaciones incluidas en la guía FOCUS (2006). Las curvas de mineralización siempre siguieron una cinética de primer orden ajustándose al modelo cinético simple de primer orden (SFO) o al modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick (HS). Los parámetros incluidos en la Tabla 4.23a y b son: constantes de mineralización (k_1 , k_2), tiempo en el cual la tasa de mineralización se ralentiza (t_b), fase lag, DT_{50} y extensión global de la mineralización (%).

En todos los casos se observa una importante influencia del envejecimiento en la mineralización del compuesto. La extensión global de mineralización de cada suelo a los diferentes tiempos del ensayo se redujo considerablemente a medida que el tiempo de envejecimiento fue mayor, sobre todo en el suelo PLS donde el porcentaje global de mineralización osciló entre 93,7% y 0,55%, para el tiempo 0 y después de 100 días de envejecimiento, respectivamente (Tabla 4.23a).

La DT_{50} se alcanza más rápidamente en los suelos cuanto menos tiempo de envejecimiento ha transcurrido (Tabla 4.23a y b), esto es lógico ya que el herbicida se encuentra más retenido en el suelo a medida que transcurre el tiempo de envejecimiento. Como se comentó en el apartado de Introducción, existen varios procesos que tienen lugar durante el envejecimiento de los compuestos orgánicos en suelos: difusión hacia los microporos del suelo, reparto dentro de la materia orgánica del suelo, alta adsorción a la superficie del suelo, o bien una combinación de estos procesos (Pignatello y Xing, 1996). Las moléculas se mueven lentamente hacia el interior de la matriz del suelo, donde los sitios resultan inaccesibles para los microorganismos. Esto ha sido observado por numerosos autores que concluyeron, para diferentes herbicidas, que el envejecimiento de éstos en el suelo durante periodos de varios años dio lugar a una disminución, tanto de su lixiviación, como de su asimilación por plantas y microorganismos (Walker y col. 2005; Sharer y col. 2003; Alexander, 2000; Gevaio y col. 2003).

Respecto a los modelos cinéticos que mejor consiguen describir la mineralización observada de Diurón, es de destacar que hasta los 30 días de envejecimiento en 9 de los 10 suelos estudiados (excepto suelo PLS) la biodegradación de Diurón siguió una cinética bifásica (HS), lo que pone de manifiesto la existencia de al menos dos fracciones del herbicida en lo que respecta a su

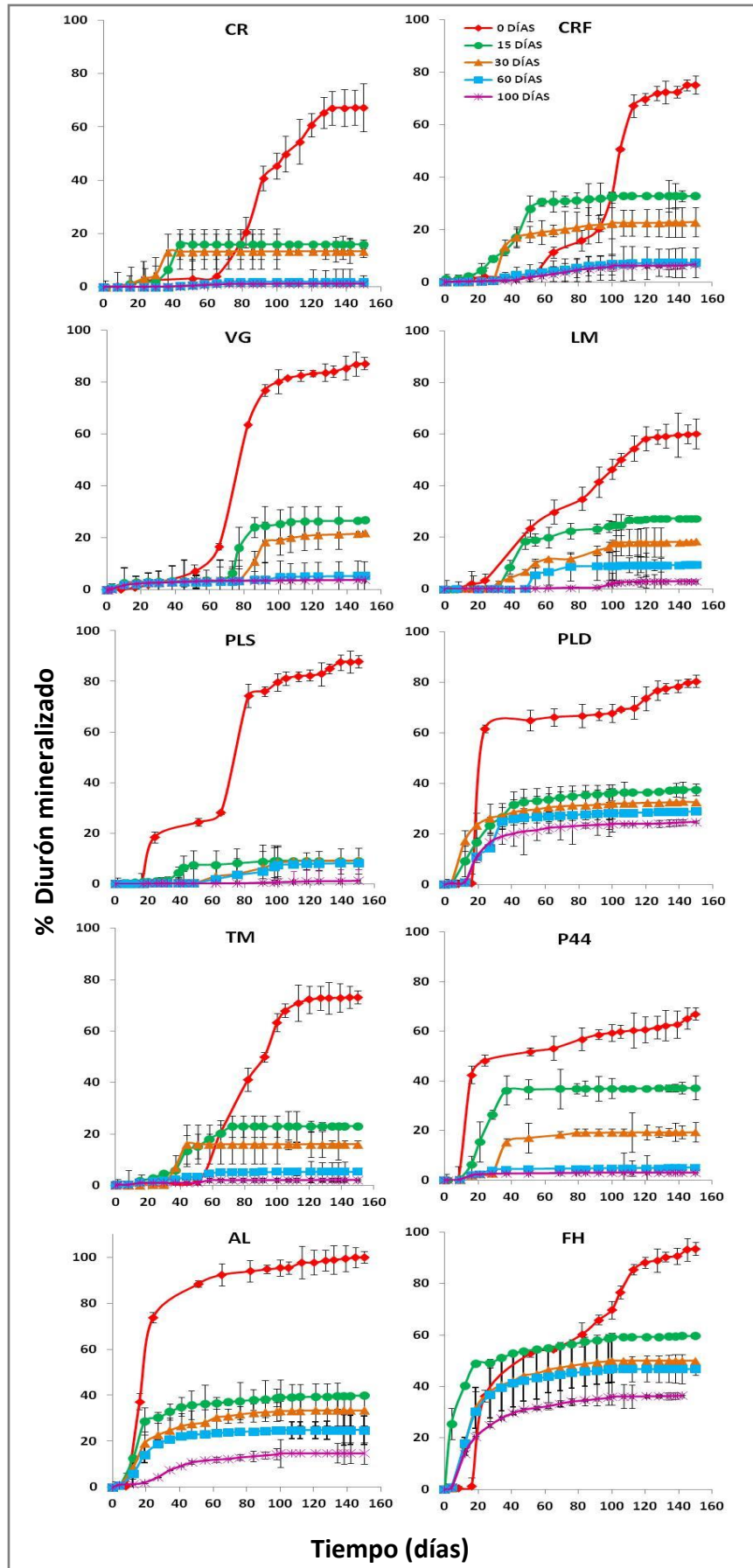


Figura 4.29. Efecto del envejecimiento en la mineralización de Diurón en 10 suelos inoculados con el consorcio bacteriano degradador específico de Diurón obtenido en la presente memoria.

Tabla 4.23a. Parámetros obtenidos a partir de la mineralización de Diurón en los suelos CR, CRF, VG, LM y PLS envejecidos a diferentes tiempos e inoculados con el consorcio bacteriano obtenido en la presente memoria.

Suelos/ Tiempo envejecido (días)		Modelo cinético	k ₁ (día ⁻¹)	k ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
CR	0	HS	2,1 10 ⁻²	3,0 10 ⁻³	131	66,20	116	67,5
	15	HS	2,0 10 ⁻²	2,0 10 ⁻⁵	30,8	39,02	26283	16,1
	30	HS	4,8 10 ⁻³	2,0 10 ⁻⁵	14,8	36,8	39998	13,3
	60	SFO	2,5 10 ⁻⁴	-	-	205,2	4914	2,20
	100	SFO	1,4 10 ⁻⁴	-	-	336,4	2721	1,24
CRF	0	HS	5,0 10 ⁻³	3,0 10 ⁻²	89,6	34	109	83,1
	15	HS	1,1 10 ⁻²	5,7 10 ⁻⁴	31,2	30	666	31,3
	30	HS	1,6 10 ⁻²	5,6 10 ⁻⁴	39,5	20	997	19,7
	60	SFO	7,5 10 ⁻⁴	-	-	68,4	921	6,67
	100	SFO	5,4 10 ⁻⁴	-	-	95,0	1294	4,47
VG	0	HS	2,0 10 ⁻³	3,2 10 ⁻²	98,6	51	118	94,9
	15	HS	3,1 10 ⁻²	5,2 10 ⁻⁴	26,5	73	372	24,5
	30	HS	2,8 10 ⁻²	3,0 10 ⁻³	18,4	80	805	21,7
	60	SFO	3,7 10 ⁻⁴	-	-	96,2	1235	5,37
	100	SFO	2,3 10 ⁻⁴	-	-	165	2846	3,84
LM	0	HS	8,1 10 ⁻³	31,2 10 ⁻³	130	26	108	60,2
	15	HS	1,2 10 ⁻²	1,5 10 ⁻³	47,6	34	370	24,7
	30	HS	3,5 10 ⁻³	1,8 10 ⁻³	52,6	38	386	16,7
	60	HS	4,7 10 ⁻³	1,1 10 ⁻⁴	64,7	53	5886	8,93
	100	SFO	1,5 10 ⁻⁴	-	-	342	4554	1,20
PLS	0	HS	7,0 10 ⁻³	3,0 10 ⁻²	65,7	24	75,51	93,7
	15	HS	1,3 10 ⁻²	4,5 10 ⁻⁴	43,2	42	741	16,5
	30	SFO	8,4 10 ⁻⁴	-	-	61,1	822	6,60
	60	SFO	7,0 10 ⁻⁴	-	-	73,3	981	5,50
	100	SFO	6,0 10 ⁻⁵	-	-	855	12037	0,55

SFO: modelo cinético simple de primer orden; HS: modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick.

k_1 : constante de mineralización hasta la tb (días⁻¹).

k_2 : constante de mineralización después de tb (días⁻¹).

tb: tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado (días).

Tabla 4.23b. Parámetros obtenidos a partir de la mineralización de Diurón en los suelos PLD, TM, P44, AL y FH envejecidos a diferentes tiempos e inoculados con el consorcio bacteriano obtenido en la presente memoria.

Suelos/Tiempo envejecido (días)		Modelo cinético	k ₁ (día ⁻¹)	k ₂ (día ⁻¹)	tb (días)	Fase lag (días)	DT ₅₀ (días)	Extensión global de mineralización (%)
PLD	0	HS	1,1 10 ⁻¹	5,0 10 ⁻³	27,6	23	25,9	77,1
	15	HS	1,1 10 ⁻²	1,1 10 ⁻³	45,4	13	327	36,5
	30	HS	2,3 10 ⁻²	1,2 10 ⁻³	17,7	15	340	32,9
	60	HS	1,1 10 ⁻²	5,1 10 ⁻⁴	42,4	17	838	28,4
	100	HS	1,5 10 ⁻²	1,1 10 ⁻³	28,0	24	496	24,6
TM	0	HS	2,0 10 ⁻²	9,1 10 ⁻⁴	128	60,0	96,1	73,2
	15	HS	2,3 10 ⁻³	5,0 10 ⁻⁵	74,7	38,3	97821	17,2
	30	HS	1,2 10 ⁻²	5,0 10 ⁻⁵	75,7	30,2	113492	15,9
	60	SFO	6,3 10 ⁻⁴	-	-	81,4	3203	6,33
	100	SFO	2,2 10 ⁻⁴	-	-	233	1109	2,47
P44	0	HS	1,2 10 ⁻¹	3,5 10 ⁻³	11,7	7	43,5	65,4
	15	HS	1,6 10 ⁻²	1,2 10 ⁻⁴	37,0	14	865	37,0
	30	HS	1,6 10 ⁻²	5,6 10 ⁻⁴	39,5	33	997,0	19,7
	60	SFO	4,9 10 ⁻⁴	-	-	105	1425	5,70
	100	SFO	2,7 10 ⁻⁴	-	-	190	2528	3,60
AL	0	HS	7,3 10 ⁻²	2,4 10 ⁻²	38,2	11	24,5	98,9
	15	HS	2,1 10 ⁻²	1,5 10 ⁻³	20,4	11	217	39,7
	30	HS	1,3 10 ⁻²	2,0 10 ⁻³	23,0	10	243	34,1
	60	HS	1,0 10 ⁻²	6,6 10 ⁻⁴	20,0	12	808	25,0
	100	HS	2,0 10 ⁻²	2,3 10 ⁻³	22,5	28	956	16,7
FH	0	HS	1,3 10 ⁻²	3,4 10 ⁻²	104	18	71,7	94,2
	15	HS	4,4 10 ⁻²	2,7 10 ⁻³	16,2	2	39,8	59,3
	30	HS	2,5 10 ⁻²	2,8 10 ⁻³	22,2	3	92,8	50,9
	60	HS	2,1 10 ⁻²	1,8 10 ⁻³	26,2	2	191	47,2
	100	HS	2,0 10 ⁻²	2,3 10 ⁻³	22,7	12	1257	43,9

SFO: Modelo cinético simple de primer orden; HS: Modelo cinético de primer orden bifásico, Hockey-Stick.

K_1 : constante de mineralización hasta la t_b (días⁻¹).

K_2 : constante de mineralización después de t_b (días⁻¹).

t_b : tiempo al cual la tasa de mineralización se ralentiza (días).

DT₅₀: tiempo al cual la mitad del herbicida inicial añadido se ha mineralizado.

adsorción en los suelos: una fracción del herbicida débilmente unida a las partículas del suelo, pudiéndose considerar ésta como rápidamente desorbible, y una fracción donde el herbicida estaría más fuertemente retenido y que algunos autores determinan como fracción difusión-dependiente que se localizaría en zonas más remotas respecto a la superficie de las partículas del suelo (Puglisi y col. 2007). A tiempo 60 y 100 días la velocidad de mineralización se redujo (Tabla 4.23a y b, e incluso en la mayoría de los suelos no se sigue un modelo HS bicompartimental (Pignatello y col. 1996; Barnier y col. 2014), sino que se ajustaron mejor al modelo SFO, indicando esto la existencia de una sola fracción del herbicida de más difícil acceso (Cornelissen y col. 2005). A partir de esta observación se puede concluir que la fracción biodisponible de Diurón sufre un proceso de envejecimiento durante los primeros 30 días, tal como se observa en los resultados correspondientes a la extensión global de mineralización, la cual se vio drásticamente reducida después de 15 días de envejecimiento respecto al tiempo 0.

Igualmente, resulta muy interesante el gran incremento que en general se observa en la duración de la fase lag a los mayores tiempos de envejecimiento (60 y 100 días), repitiéndose este comportamiento prácticamente en casi todos los suelos estudiados. Los resultados obtenidos están relacionados con el hecho de que a lo largo del tiempo la intensidad en la adsorción de un contaminante en el suelo aumenta, ya que durante el envejecimiento las moléculas van quedando más fuertemente asociadas al suelo (Barraclough y col. 2005) después de sufrir los procesos de difusión que llevaría al herbicida a interaccionar con los puntos de adsorción de mayor energía. Ello puede limitar la capacidad de los microorganismos presentes para degradar los contaminantes retenidos en los mismos al verse reducida la bioaccesibilidad del herbicida, dando lugar a un aumento en su persistencia, pero al ser cada vez menos biodisponibles se va disminuyendo el riesgo tóxico en el medio ambiente. La degradación microbiana es el principal mecanismo responsable de la disipación de muchos compuestos orgánicos presentes en el suelo (Grant y col. 2002) como ocurre en el caso de Diurón (Giacomazzi y Cochet, 2004).

En general, hay un descenso en la biodisponibilidad de un contaminante cuando se produce la formación de residuos a través de los procesos de envejecimiento y como resultado, los contaminantes retenidos pasan a constituir una fracción no biodisponible (Semple y col. 2004). Kelsey y Alexander (1997) observaron que la mineralización de naftaleno por *Pseudomonas putida* se reducía a lo largo del tiempo (0-68 días). Semple y col. (2006) estudiaron la biodegradación de fenantreno por *Pseudomonas* sp. a lo largo del tiempo, observando que la fracción bioaccesible disminuía a medida que aumentaba el tiempo de envejecimiento. Fenlon y col. (2011) también observaron un descenso en la mineralización del plaguicida cipermetrina en suelos como consecuencia del envejecimiento, y concluyeron que ese descenso estaba relacionado con la

disminución de la biodisponibilidad del plaguicida sufrida como consecuencia de la formación de un residuo recalcitrante del mismo debido a su envejecimiento.

4.7.2. Efecto del envejecimiento en la extracción de Diurón con 3 extractantes no exhaustivos en los suelos seleccionados

Los experimentos de extracción se llevaron a cabo en los mismos suelos autoclavados que se usaron en el apartado anterior contaminados de forma artificial en el laboratorio a una concentración de Diurón inicial de 50 mg kg^{-1} , y dejados envejecer durante distintos periodos de tiempo, tal como se expuso en el apartado 3.2.9.1 de Materiales y Métodos. Tal como se comentó anteriormente, la totalidad de Diurón añadido estaba presente tras los distintos tiempos de envejecimiento antes de proceder a su extracción. En este estudio se emplearon 3 extractantes de diferente hidrofobicidad: una solución de CaCl_2 (10 mM), una solución HPBCD a una concentración 10 veces la concentración molar de Diurón y butanol.

Se realizó un estudio preliminar para determinar qué concentración de HPBCD era capaz de mostrar una mayor eficacia extractante del herbicida (Figura 4.30). Se emplearon las mismas condiciones que en el resto de experiencias que se proponen en este apartado, $1 \text{ g} / 5 \text{ mL}$, igualmente comparadas con aquellas empleadas en las mineralizaciones ($10 \text{ g} / 50 \text{ mL}$) en dos suelos de los estudiados en esta Tesis (FH y CR) seleccionados por ser los dos suelos que presentan las mayores diferencias respecto al contenido en MO, para poder así extrapolar los resultados obtenidos a todos los demás suelos estudiados. El efecto extractante de la solución de HPBCD 10 veces la cantidad molar del herbicida inicialmente añadido (HPBCD x10) prácticamente fue similar a cuando se emplearon concentraciones superiores de HPBCD (x100, x500, x1000).

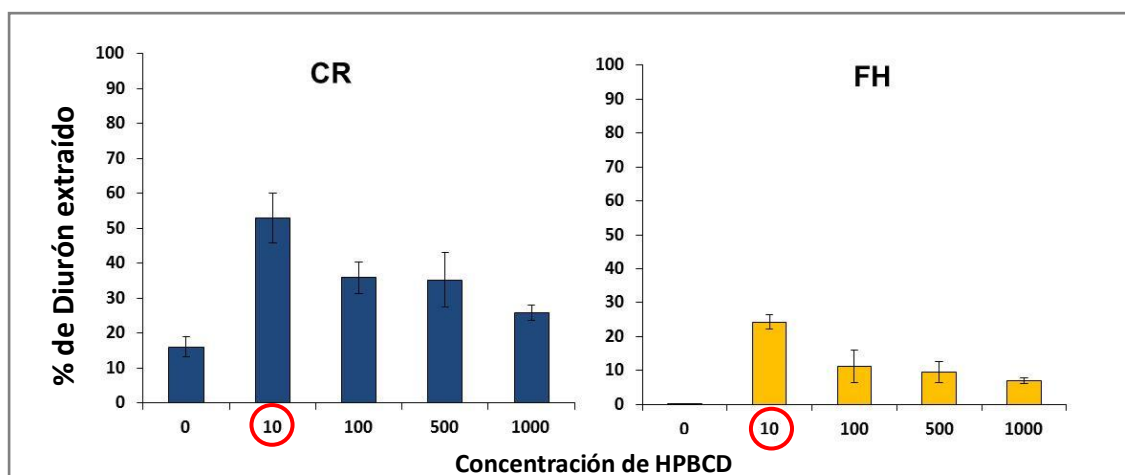


Figura 4.30. Porcentajes de Diurón extraído cuando se empleó como solución extractante HPBCD a concentraciones de 0, 10, 100, 500 y 1000 veces la concentración molar del herbicida Diurón (50 mg kg^{-1}).

En la Figura 4.31 se muestra el porcentaje extraído de Diurón con los 3 extractantes seleccionados, observándose una disminución de la extracción conforme aumenta el tiempo de envejecimiento (0, 15, 30, 60 y 100 días). Ello parece indicar que el contacto prolongado de Diurón con los suelos contribuye a su adsorción, gracias a los procesos de difusión en los poros del mismo, moviéndose las moléculas del adsorbato hacia el interior de las partículas del adsorbente y adsorbiéndose en ellos por enlaces físicos o químicos. La desorción del herbicida desde estos sitios se hace cada vez más difícil y puede llegar a ser prácticamente irreversible con una técnica de extracción no exhaustiva para un porcentaje alto de Diurón adsorbido. Ling y col. (2009) realizaron extracciones de fenantreno y pireno con butanol en suelos envejecidos entre 0 y 60 días y observaron cómo disminuía la capacidad extractante en función del tiempo. En la extracción del herbicida en los 10 suelos con butanol, extractante más exhaustivo de los estudiados por ser el más hidrofóbico, fue en la que se obtuvieron mayores porcentajes de extracción de Diurón, aunque para la mayoría de los suelos no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de extracción con butanol y con HPBCD x10 (Figura 4.31). Kelsey y col. (1997) fueron los primeros que dedujeron que las extracciones con butanol eran las más apropiadas, comparadas con CaCl_2 , para estimar la biodisponibilidad del fenantreno.

Sin embargo, otros autores han demostrado que el uso de CD como técnica de extracción puede resultar muy útil (Ko y Yoo. 2003; Sheremata y Hawari 2000; Mólnar y col. 2009; Wong y col. 2010; Bernhardt y col. 2013; Riding y col. 2013; Cachada y col. 2014). En estos resultados existen diferencias en las cantidades extraídas del herbicida con soluciones de CaCl_2 o HPBCD siendo llamativas en la mayoría de los suelos (Figura 4.31), indicando esto que la extracción con HPBCD resulta bastante más efectiva. Sin embargo, la cantidad extraída utilizando la solución de HPBCD x10 fue muy similar a las cantidades extraídas con la solución de CaCl_2 al ir aumentando el tiempo de envejecimiento. Algo que se debe a la progresiva reducción de la fracción biodisponible del herbicida con el tiempo de envejecimiento permaneciendo biodisponible únicamente la fracción disuelta en la solución del suelo o aquella muy débilmente adsorbida a las partículas del suelo, siendo las únicas fracciones que pueden llegar a ser extraídas tanto por la solución del electrolito como por HPBCD 10.

La eficacia de extracción de una solución acuosa como es la HPBCD se debe a la formación de complejos de inclusión en solución entre la molécula hidrofóbica del herbicida y la CD, tal como se ha explicado a lo largo de todos los apartados anteriores de la presente memoria, actuando HPBCD como agente extractante de las moléculas del herbicida Diurón que están adsorbidas. La aplicabilidad de HPBCD para predecir la fracción biodisponible de PAHs se ha demostrado en

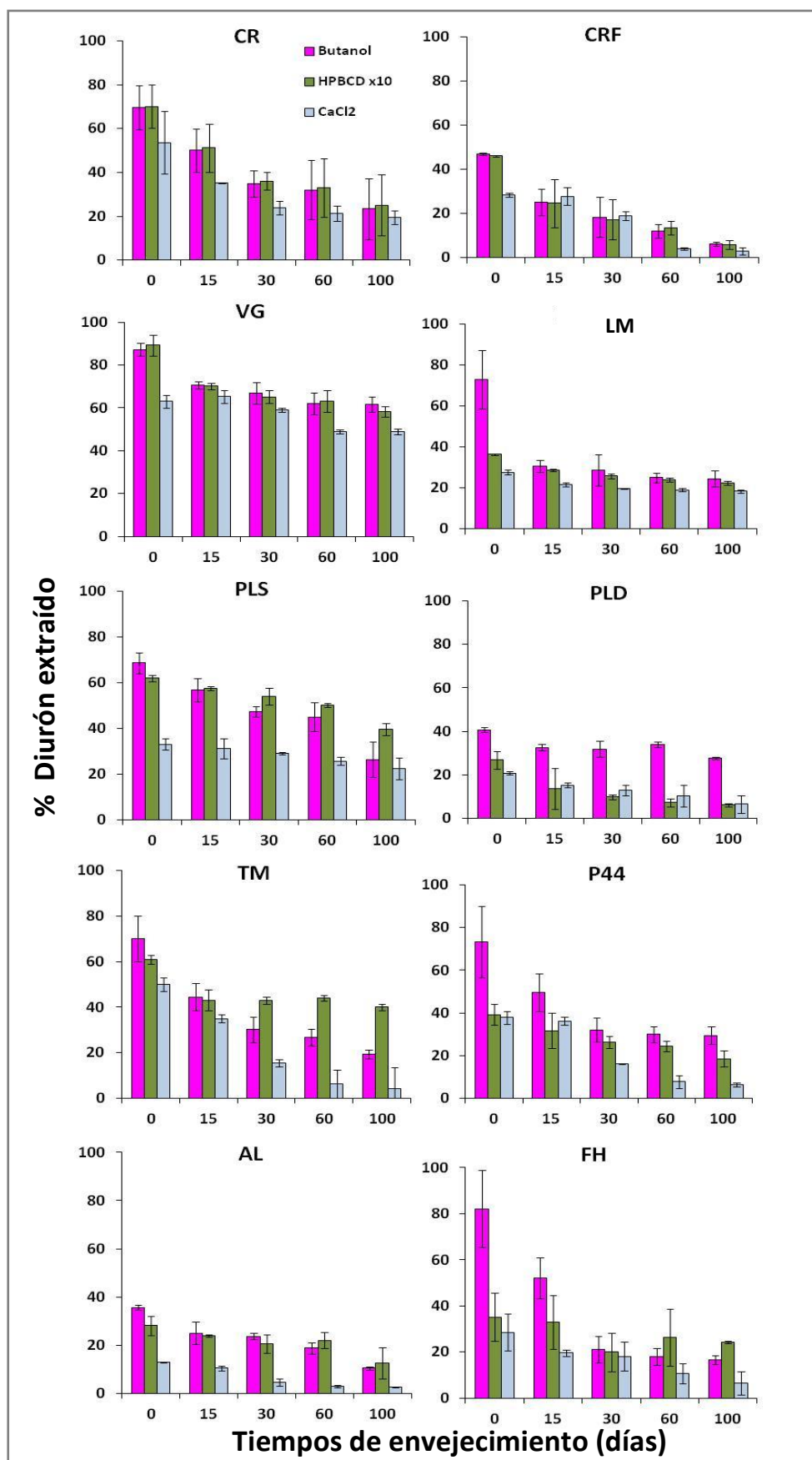


Figura 4.31. Porcentaje de Diurón extraído empleando 3 extractantes no exhaustivos, butanol, solución de CaCl₂ y HPBCD x10, en los 10 suelos estudiados y contaminados a una concentración de 50 mg kg⁻¹, después de 0, 15, 30, 60 y 100 días de envejecimiento.

diferentes estudios (Reid y col. 2000; Allan y col. 2006). Wong y Bidleman (2010) emplearon HPBCD como extractante no exhaustivo en herbicidas organoclorados (OCs) y en bifenil policlorados (PCBs) en suelos y concluyeron que HPBCD podría ser un agente de extracción apropiado para distinguir entre la fracción fácil o difícilmente extraíble de esos herbicidas.

Es interesante señalar el hecho de que en general la cantidad extraída por los tres extractantes a tiempo 0 y 15 días es diferente, pero para el resto de los tiempos de envejecimiento permanece prácticamente constante incluso usando butanol. Este efecto que se observa pone de manifiesto de nuevo que en los primeros tiempos de envejecimientos tienen lugar los procesos de difusión de una parte del herbicida adsorbido hacia el interior de las partículas del suelo en busca de sitios de mayor afinidad de enlace, así como la reestructuración de la MO como consecuencia de los procesos de adsorción previamente comentados, dando lugar a la adsorción en ciertas posiciones de las que es imposible extraerlo incluso usando butanol para el resto de los tiempos de envejecimiento.

El hecho de que la extracción de Diurón en estos suelos con una amplia variedad de propiedades se haya reducido tanto en tan solo 100 días de envejecimiento parece indicar que este herbicida podría no presentar problemas en cuanto a su posible desorción a mayores tiempos de contacto con el suelo, por lo que va a estar poco disponible en la solución del mismo y, consecuentemente, no van a existir problemas de movilidad en él, por lo que aunque el suelo esté contaminado con Diurón podría no ser peligro, dada su alta irreversibilidad después de un tiempo en contacto con el suelo.

4.7.3. Evaluación de la biodisponibilidad de Diurón envejecido y estimación de la biorrecuperación de suelos contaminados

Las correlaciones lineales entre el porcentaje de Diurón mineralizado y la fracción extraíble en los 10 suelos estudiados a diferentes tiempos de envejecimiento se muestran en las Figuras 4.32a y b. Las cantidades extraídas con los tres extractantes estudiados y el porcentaje global de mineralización quedan reflejados en la Tabla 4.24.

En general, correlacionando los porcentajes extraídos con butanol o HPBCD con los porcentajes de Diurón mineralizado en los 10 suelos se obtuvo un R^2 que osciló entre 0,98-0,83 en el caso de butanol y entre 0,99-0,72 para HPBCD, a excepción del suelo PLS que para ambos extractantes dio un R^2 muy bajo (0,62 y 0,50 para butanol y HPBCD, respectivamente). En las correlaciones obtenidas para las cantidades extraídas con CaCl_2 se obtiene un R^2 entre 0,98 - 0,41, presentando 3 de los suelos valores $< 0,5$. La información que aportan los valores de R^2 no permiten establecer cuál es el agente extractante más idóneo para estimar la biodisponibilidad del herbicida en los

suelos investigados. La pendiente y la intersección de la curva en el eje y (% de diurón mineralizado), realmente son las que deben ser consideradas (Reid y col. 2000), es decir, los valores ideales para concluir que la extracción no exhaustiva puede ser empleada para evaluar la biodisponibilidad de Diurón en un suelo contaminado serían que la pendiente fuera lo más cercana al valor 1 y la intersección con el eje Y fuera, en la medida de lo posible, lo más parecido al valor 0.

Observando detalladamente las correlaciones obtenidas al emplear el extractante más hidrofóbico y por lo tanto el más exhaustivo de los estudiados, butanol, se muestra que dichas extracciones logran mimetizar la actividad biológica del consorcio bacteriano empleado en algunos de los suelos investigados, resaltando sobre todo los suelos CRF, LM, P44 y TM (pendientes 2,07, 1,07, 1,33 y 1,37, intersecciones 15,3, 16,5, 30,7 y 29,2) (Figura 4.32a y b) aunque al ser las pendientes mayores de 1 para 9 de los 10 suelos (excepto en el caso del suelo FH), se concluye que los datos de extracción subestiman los resultados de mineralización en la mayoría de los suelos. Tang y Alexander, (1999) estudiaron las correlaciones entre extracciones con propanol, butanol y acetato de etilo y la biodegradación de 3 PAHs, antraceno, fluoranteno y pireno envejecidos, concluyendo que las extracciones con butanol podrían predecir la biodisponibilidad de estos PAHs en el suelo.

Las mejores correlaciones después de las observadas al usar butanol como extractante fueron aquellas obtenidas al emplear HPBCD como extractante (pendientes entre 1,43-6,39 y las intersecciones entre -148 y 7,68). Se observa en la Figura 4.32a y b que en todos los casos las pendientes son también mayores de 1 al emplear HPBCD como extractante, por lo que los datos de extracción subestiman de nuevo los resultados de mineralización. Otros autores consiguieron una buena correlación entre la extracción con HPBCD y la degradación de contaminantes como PAHs (Reid y col. 2000; Doick y col. 2005, Papadopoulos y col. 2007; Hickman y col. 2008; Gao y col. 2014). Cornelissen y col. (1998) y Cuypers y col. (2002) también observaron una excelente correlación entre las extracciones con Tenax y HPBCD y la degradación de PAHs. Una observación común en estudios previos muestran que en PAHs de bajo a medio peso molecular existen buenas correlaciones entre lo extraído y lo biodegradado pero cuando los PAHs son de alto peso molecular, la biodegradación está sobreestimada (Cornelissen y col. 1998; Cuypers y col. 2002; Juhasz y col. 2005; Stroud y col. 2009). Bernhardt y col. (2013) concluyen que los resultados de la degradación de PAHs de alto peso molecular en suelos están limitados por la baja desorción de estos compuestos. Crampon y col. (2014), confirmaron que la extracción no exhaustiva con HPBCD de la fracción biodisponible de PAHs era capaz de predecir la fracción bioaccesible en ensayos de biodegradación con unos R^2 que oscilaban entre 0,815 y 0,989 en los suelos

estudiados. Gomez-Eyles y col. (2010) también demostraron la fuerte correlación que existía entre sus estudios de extracción con HPBCD y las mineralizaciones realizadas.

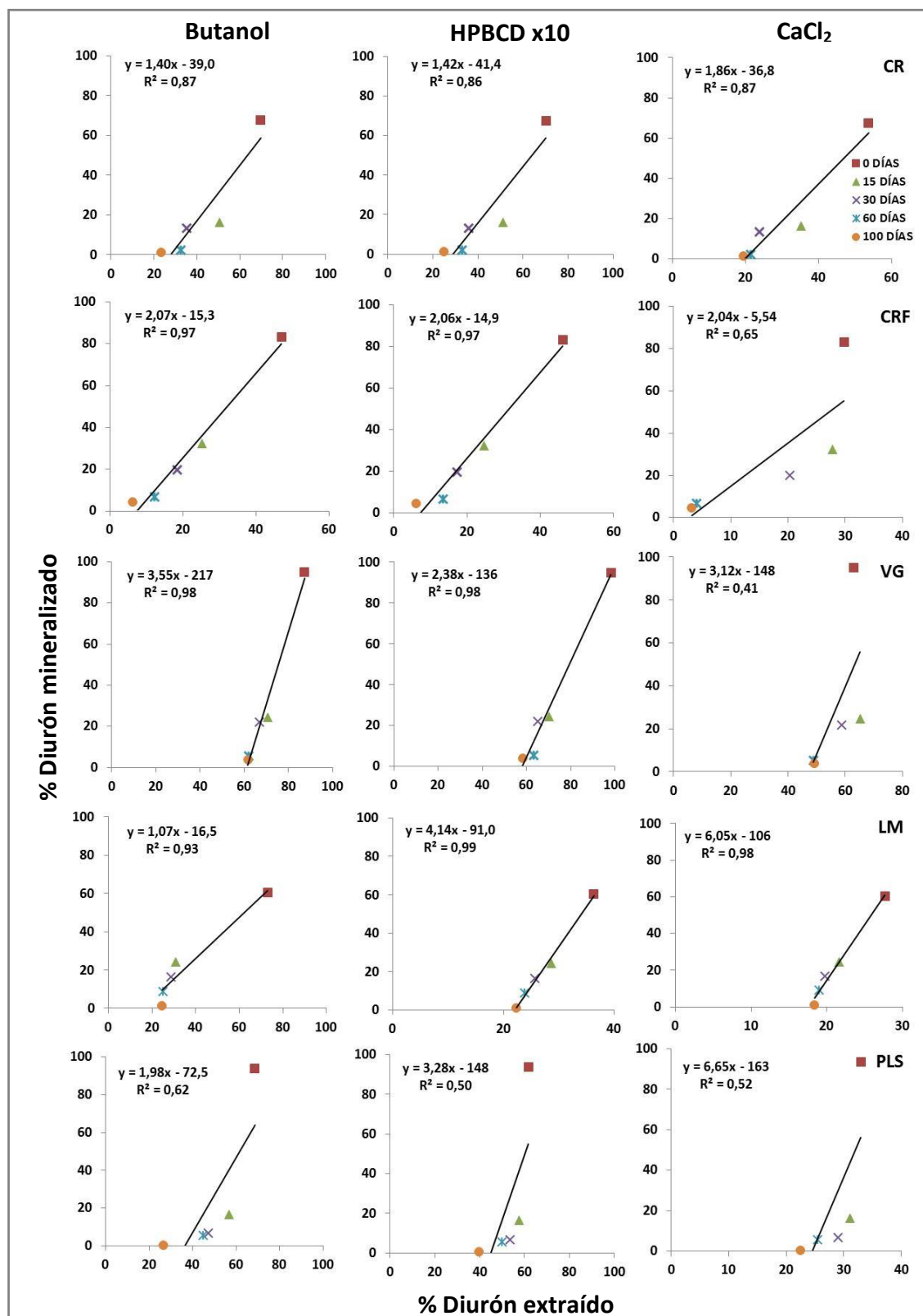


Figura 4.32a. Correlación entre el porcentaje de Diurón mineralizado y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl₂ para los suelos CR, CRF, VG, LM y PLS después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (×), 60 (*) y 100 (●) días.

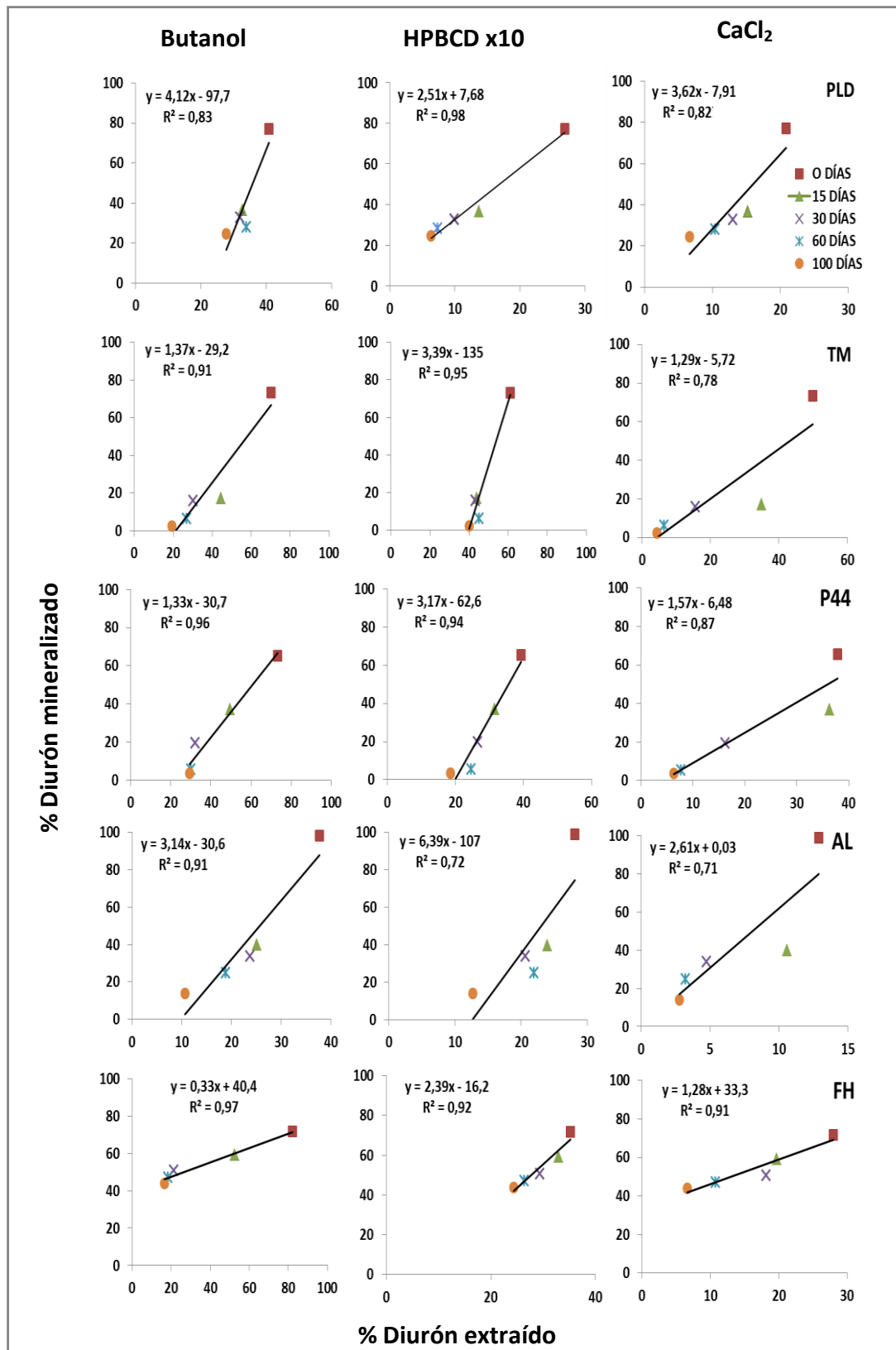


Figura 4.32b. Correlación entre el porcentaje de Diurón mineralizado y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl₂ para los suelos PLD, TM, P44, AL y FH después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (×), 60 (*) y 100 (●) días.

Tabla 4.24. Porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl_2 y porcentaje de Diurón mineralizado a diferentes tiempos de envejecimiento en los 10 suelos. Concentración inicial de Diurón 50 mg kg^{-1} .

Suelos/ Tiempo de envejecimiento	¹⁴ C-Diurón mineralizado (%)				Suelos/ Tiempo de envejecimiento	% Extraído de Diurón				¹⁴ C-Diurón mineralizado (%)	
	BuOH	HPBCD	CaCl ₂			BuOH	HPBCD	CaCl ₂			
CR	0	69,7 (± 9,80)	70,1 (± 9,92)	53,7 (± 14,2)	67,5 (± 2,41)	PLD	0	40,7 (± 1,35)	26,9 (± 4,01)	20,0 (± 0,72)	77,1 (1,62)
	15	50,1 (± 10,1)	51,2 (± 11,4)	35,2 (± 0,14)	16,1 (± 5,53)		15	32,6 (± 3,45)	13,7 (± 9,44)	15,4 (± 1,12)	36,5 (3,28)
	30	34,9 (± 6,24)	36,0 (± 4,52)	23,9 (± 2,95)	13,3 (± 6,58)		30	31,9 (± 4,26)	9,90 (± 1,19)	13,0 (± 2,25)	32,9 (6,07)
	60	32,1 (± 13,5)	33,2 (± 13,5)	21,3 (± 3,59)	2,20 (± 0,21)		60	33,9 (± 6,14)	7,28 (± 1,99)	10,3 (± 4,95)	28,4 (1,52)
	100	23,5 (± 13,9)	25,2 (± 13,9)	19,4 (± 3,08)	1,24 (± 0,04)		100	27,8 (± 3,25)	6,31 (± 0,72)	6,63 (± 4,12)	24,6 (3,07)
CRF	0	47,0 (± 0,40)	46,1 (± 0,41)	29,8 (± 1,27)	83,1 (± 3,34)	TM	0	70,2 (± 4,25)	61,0 (± 2,01)	49,9 (± 3,04)	73,2 (4,99)
	15	25,2 (± 6,22)	24,6 (± 11,2)	27,8 (± 4,52)	31,3 (± 1,52)		15	44,4 (± 7,36)	43,9 (± 4,53)	34,9 (± 1,75)	17,2 (4,01)
	30	18,4 (± 9,02)	17,3 (± 9,02)	20,4 (± 2,18)	19,7 (± 6,02)		30	30,2 (± 2,81)	43,1 (± 1,60)	15,6 (± 1,51)	15,9 (7,57)
	60	12,1 (± 3,22)	13,5 (± 3,26)	4,10 (± 0,51)	6,67 (± 1,24)		60	26,8 (± 9,49)	44,3 (± 1,27)	6,40 (± 6,18)	6,33 (0,16)
	100	6,20 (± 1,51)	6,0 (± 2,03)	3,25 (± 1,84)	4,47 (± 2,22)		100	19,3 (± 20,8)	40,1 (± 1,45)	4,32 (± 9,25)	2,47 (0,74)
VG	0	87,2 (± 3,01)	98,2 (± 5,02)	63,0 (± 2,93)	94,9 (± 1,23)	P44	0	73,3 (± 2,28)	39,3 (± 4,72)	37,8 (± 3,12)	65,4 (4,92)
	15	70,6 (± 1,60)	70,1 (± 1,60)	65,2 (± 3,25)	24,5 (± 2,36)		15	49,5 (± 13,9)	31,6 (± 8,28)	36,3 (± 1,75)	37,0 (4,26)
	30	66,9 (± 5,13)	65,2 (± 3,25)	58,9 (± 0,97)	21,7 (± 0,25)		30	32,1 (± 13,8)	26,5 (± 2,83)	16,2 (± 0,16)	19,7 (1,47)
	60	62,2 (± 5,08)	63,2 (± 5,07)	48,8 (± 0,89)	5,37 (± 1,14)		60	30,0 (± 2,51)	24,7 (± 2,37)	7,74 (± 2,91)	5,70 (0,52)
	100	61,6 (± 3,65)	58,2 (± 2,53)	49,1 (± 1,30)	3,84 (± 4,03)		100	29,5 (± 4,25)	18,5 (± 3,74)	6,35 (± 0,82)	3,60 (0,10)
LM	0	73,0 (± 14,3)	36,3 (± 0,29)	27,6 (± 1,17)	60,2 (± 4,80)	AL	0	35,7 (± 5,01)	28,1 (± 3,88)	12,9 (± 0,11)	98,9 (4,73)
	15	30,7 (± 3,12)	28,7 (± 0,42)	21,6 (± 1,08)	24,7 (± 1,32)		15	25,1 (± 12,9)	23,9 (± 0,44)	10,6 (± 1,24)	39,7 (7,68)
	30	28,6 (± 7,56)	25,7 (± 1,10)	19,8 (± 0,26)	16,7 (± 0,92)		30	23,7 (± 3,01)	20,6 (± 3,74)	4,73 (± 1,52)	34,1 (4,18)
	60	25,0 (± 2,28)	23,9 (± 0,98)	18,9 (± 0,68)	8,93 (± 5,49)		60	18,8 (± 2,04)	21,9 (± 3,29)	3,20 (± 0,55)	25,0 (0,43)
	100	24,5 (± 3,82)	22,3 (± 0,89)	18,3 (± 0,75)	1,20 (± 4,31)		100	10,6 (± 1,35)	12,7 (± 6,40)	2,78 (± 0,22)	16,7 (6,09)
PLS	0	68,6 (± 4,67)	61,9 (± 1,28)	32,9 (± 2,50)	93,7 (± 2,71)	FH	0	82,2 (± 6,81)	35,2 (± 10,5)	28,1 (± 8,21)	71,7 (2,74)
	15	56,8 (± 5,03)	57,5 (± 0,94)	31,1 (± 4,28)	16,5 (± 6,17)		15	52,5 (± 6,02)	32,9 (± 11,8)	19,7 (± 1,38)	59,3 (0,45)
	30	47,3 (± 2,34)	53,8 (± 3,67)	29,2 (± 0,66)	6,60 (± 6,01)		30	21,2 (± 2,15)	29,3 (± 8,35)	18,1 (± 6,34)	50,9 (8,26)
	60	44,9 (± 6,30)	50,2 (± 0,83)	25,5 (± 1,75)	5,50 (± 1,42)		60	18,2 (± 0,21)	26,3 (± 12,3)	10,7 (± 4,21)	47,2 (13,9)
	100	26,4 (± 7,66)	39,6 (± 2,73)	22,4 (± 4,68)	0,55 (± 0,10)		100	16,7 (± 1,97)	24,4 (± 0,52)	6,63 (± 4,97)	43,9 (0,26)

Actualmente existe muy poca literatura científica que correlacione la degradación de herbicidas con extracción química. Clegg y col. (2014) estudiaron la biodisponibilidad del fungicida azoxystrobin a lo largo del tiempo correlacionándola con extracciones no exhaustivas (H_2O , CaCl_2 y HPCD) concluyendo que la presencia de la MO en los suelos empleados favorecen el proceso de envejecimiento, reduciendo así la fracción fácilmente desorbible con las extracciones químicas y la fracción potencialmente bioaccesible de los plaguicidas en el suelo.

Las correlaciones obtenidas al emplear CaCl_2 como extractante fueron las que peores resultados dieron, como se ha señalado anteriormente. Las pendientes oscilaron entre 1,28-6,65 y las intersecciones entre -163 y 33,3. Los datos de extracción subestimaron los resultados de mineralización en todos los suelos (Figura 4.32a y b y Tabla 4.24) siendo resultados lógicos ya que CaCl_2 presenta la menor capacidad extractante de los tres empleados.

Con estos resultados se podría considerar que la técnica de extracción con butanol es la que imita más estrechamente los mecanismos que gobiernan la biodisponibilidad del contaminante hacia microorganismos degradadores específicos pudiendo proporcionar un medio fiable para determinar la fracción biodisponible del herbicida Diurón de un suelo y aplicarse en la evaluación de la aplicación de técnicas de biorrecuperación de suelos contaminados con Diurón.

A modo resumen, la extracción en orden decreciente de los tres extractantes probados fue en primer lugar, butanol, seguidamente HPBCD y por último, CaCl_2 , quedando reflejado en la Figura 4.33, en la cual se representan la media de los porcentajes de extracción, de los tres extractantes empleados, respecto a la media del porcentaje total de Diurón mineralizado en los 10 suelos a todos los tiempos de envejecimiento.

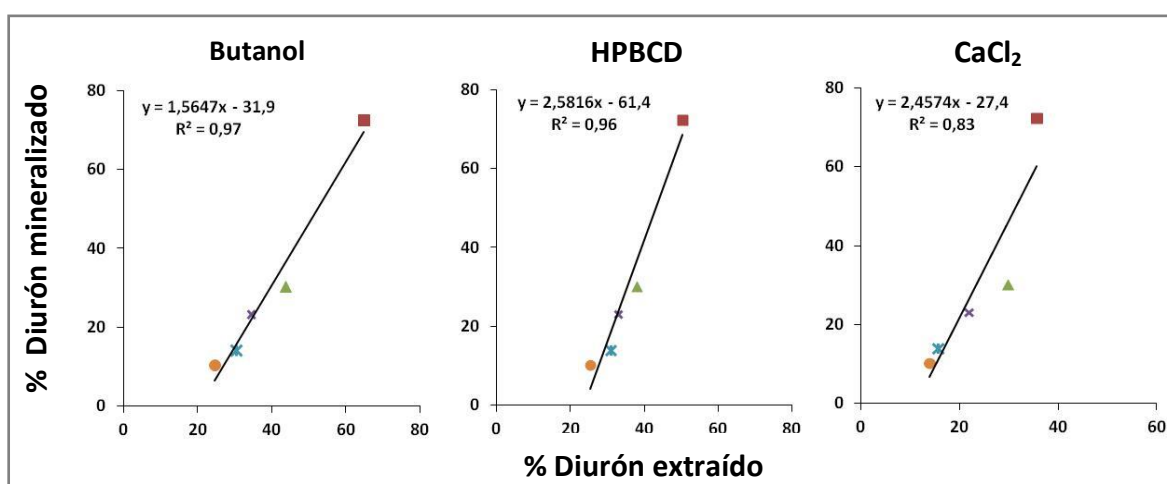


Figura 4.33. Correlación lineal global entre el porcentaje medio extraído y el porcentaje medio mineralizado en 10 suelos a diferentes tiempos de envejecimiento para cada extractante empleado.

4.8. ESTIMACIÓN DEL RIESGO TÓXICO DE DIURÓN ENVEJECIDO EN SUELOS CONTAMINADOS

En el apartado anterior nos hemos centrado en conseguir una técnica química rápida y eficaz capaz de estimar la fracción biodisponible del herbicida Diurón en el sistema suelo-agua, la cual fue confirmada a partir de los ensayos de mineralización del herbicida a través del empleo de un consorcio degradador específico de Diurón a diferentes tiempos de envejecimiento. Gracias a este estudio se ha podido estimar la capacidad de biorrecuperar un suelo contaminado a partir de la realización de extracciones no exhaustivas, sin embargo, aunque el riesgo tóxico de un contaminante se encuentra directamente relacionado con la fracción biodisponible del mismo (Cachada y col. 2014), a la hora de evaluar este riesgo, sería conveniente realizar ensayos con organismos diana (organismos superiores). Estas afirmaciones vienen recogidas en el texto desarrollado en la norma ISO17402:2011 sobre requisitos para la selección y aplicación de métodos para la estimación de la biodisponibilidad de contaminantes en el suelo, dónde dentro de los requisitos se incluye la necesidad de realizar estudios tanto de biodisponibilidad como de ecotoxicidad, detallando en este último la susceptibilidad de los organismos que no son los diana (malezas) sino aquellos a los que hay que proteger, en nuestro caso, las plantas de cultivo. La exposición de los seres humanos, animales, plantas o microorganismos a un tóxico envejecido en el suelo es menor que a la misma concentración del compuesto que está totalmente disponible, y el riesgo tóxico que presenta, en consecuencia, es menor (Chung y Alexander 1998).

4.8.1. Ensayos de ecotoxicidad en plantas

A partir de lo expuesto, se plantearon la realización de estudios de biotoxicidad del herbicida Diurón en una planta de cultivo, tal como queda explicado en el apartado 3.2.9.2 de Materiales y Métodos. Para llevar a cabo estos experimentos se seleccionaron los 10 suelos estudiados en esta Memoria (Tabla 2.1,) y el cultivo elegido fue la cebada, *Hordeum vulgare*. En estos ensayos se usó una concentración de 5 mg kg^{-1} (equivalente a 5 kg ha^{-1}). Previamente, se habían llevado a cabo estudios de biotoxicidad a diferentes concentraciones inferiores (Figura no mostrada), y a concentraciones superiores a 5 mg kg^{-1} para simular un suelo contaminado, pero se observaba una inhibición en el crecimiento del 100% en todos los tiempos de envejecimiento y no se observaron diferencias significativas, por lo que se eligió la concentración de 5 mg kg^{-1} para la obtención de resultados de estimación de riesgo en función del tiempo de envejecimiento y/o de las propiedades físico-químicas del suelo. En este sentido, para observar el efecto tóxico que tiene la cantidad de herbicida presente en cada suelo sobre la actividad biológica en plantas, se han determinado los porcentajes de inhibición del peso de la parte aérea de la planta, talla y

número de semillas que germinan respecto a un ensayo control sin la presencia del herbicida (Figura 4.34).

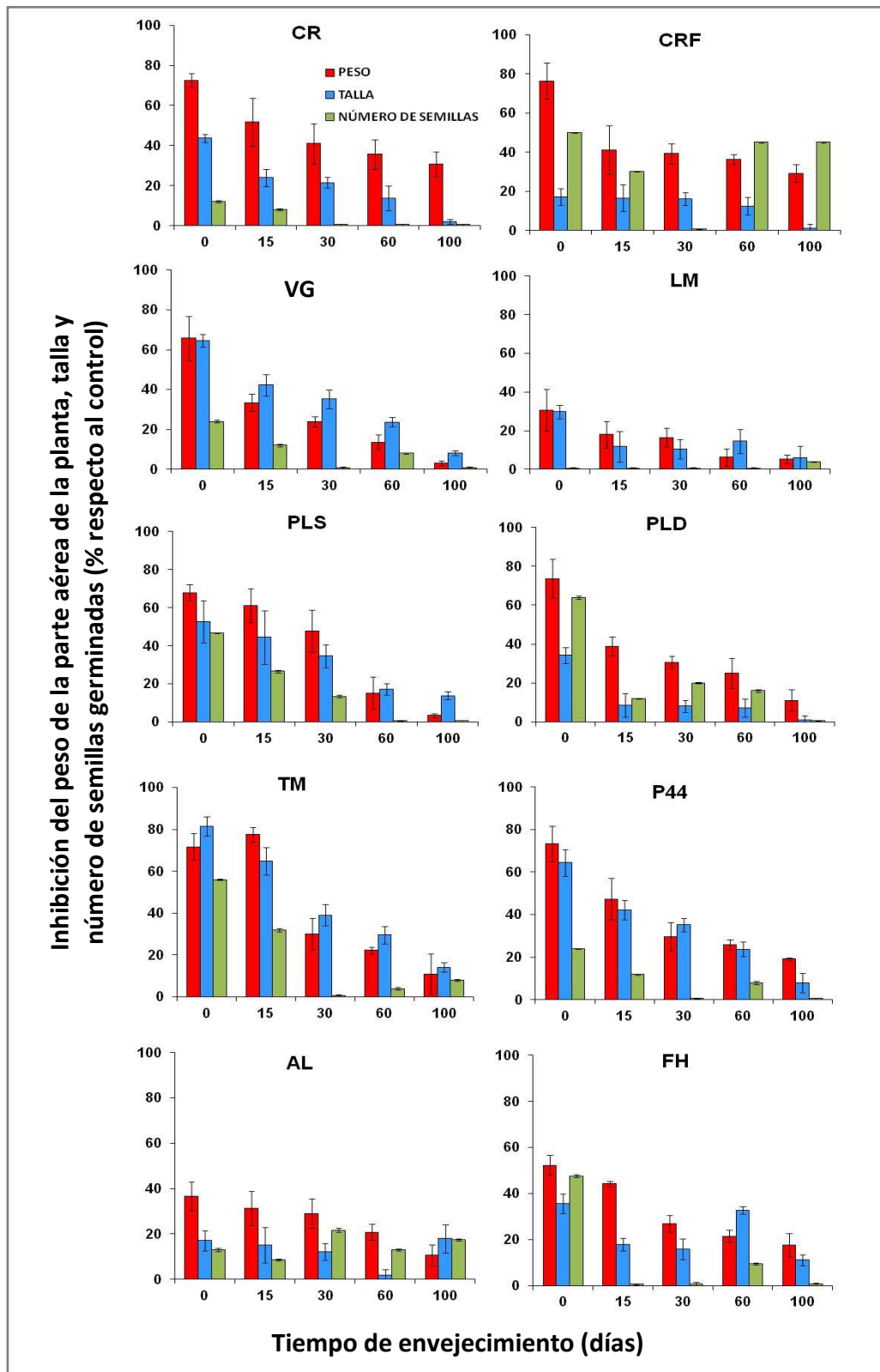


Figura 4.34. Porcentaje de inhibición del peso de la parte aérea de la planta, talla y número de semillas que germinan en los 10 suelos previamente contaminados con Diurón (5 mg kg^{-1}) y dejados envejecer durante 0, 15, 30, 60 y 100 días.

Hay que tener en cuenta que los suelos fueron autoclavados antes de proceder a ser envejecidos, por lo que el día de la siembra de las semillas de cebada el 100% de Diurón con el que habían sido dopados estaba presente. Además, se supone que no debe de haber una pérdida apreciable del mismo por degradación ya que el experimento tuvo lugar en solo 12 días desde la siembra de las semillas, tiempo insuficiente para que el herbicida sea degradado, tal como muestra la Figura 4.20a y b en la que incluso en presencia de la flora endógena de estos suelos no se observó mineralización en tan poco espacio de tiempo.

De forma general, en los 10 suelos empleados en el ensayo de ecotoxicidad respecto a los tiempos de envejecimiento estudiados se aprecia que los porcentajes de inhibición correspondientes a los parámetros analizados disminuían a medida que se alcanzaban mayores tiempos de envejecimiento, es decir, a menor tiempo de envejecimiento la presencia del herbicida provocaba un mayor efecto tóxico. Estos resultados obtenidos son lógicos, ya que a medida que pasa el tiempo el herbicida Diurón se encuentra más retenido y está más fuertemente adsorbido por las partículas del suelo y, por tanto los parámetros estudiados se podrían comportar como si el herbicida no estuviera presente en el suelo.

De los 3 parámetros seleccionados, el que mostró diferencias más significativas fue el peso de la parte aérea de la planta en los suelos estudiados a lo largo de los diferentes tiempos de envejecimiento. En la Figura 4.35 y en la Tabla 4.25 se muestran los porcentajes de inhibición del peso de la parte aérea de la planta a los diferentes tiempos de envejecimiento para cada suelo.

A tiempo 0, se observa que los porcentajes de inhibición del peso de la planta empleada están por encima del 50% en todos los suelos, excepto en LM y AL (30,5% y 36,6%, respectivamente) (Figura 4.35, Tabla 4.25). Posiblemente, el contenido en MO y en óxidos amorfos de ambos suelos esté influyendo en estos resultados. Ambas propiedades resultan ser las principales responsables de la adsorción de Diurón en los suelos estudiados (apartado 4.2) observándose aquí que los suelos que muestran la mayor capacidad de adsorción, LM, AL y FH, presentan más reducida la fracción disponible de Diurón. También se puede observar que a los 100 días, último tiempo de envejecimiento del ensayo, en la mayoría de los suelos, excepto en CR, CRF, FH y P44, el porcentaje inhibido es próximo o menor del 10% (Figura 4.35, Tabla 4.25). Es decir, el herbicida Diurón está envejecido, de manera que el peso de la planta es prácticamente similar al del peso del ensayo control de cada uno de los suelos.

Por todos los resultados mencionados, tras la aplicación de este herbicida en el suelo con una dosis de 5 mg kg^{-1} (equivalente a 5 kg ha^{-1}) el porcentaje de inhibición en el crecimiento de la zona aérea de la planta decrece a tiempos mayores a 100 días hasta concentraciones por debajo de nivel de efectividad mínima tóxica.

No existe mucha bibliografía que demuestre la biotoxicidad del herbicida Diurón a lo largo del tiempo, pero sí existen estudios de biotoxicidad en presencia de otros herbicidas y PAHs (Cunningham y Berti, 1993; del Amor y col., 2008; Vranova y col. 2013). Cachada y col (2014) concluyeron que existe una correlación directa entre la concentración de PAH en suelo y en la planta y, que la toxicidad de la planta dependerá de la especie, del contaminante y de las propiedades del suelo que se estudie.

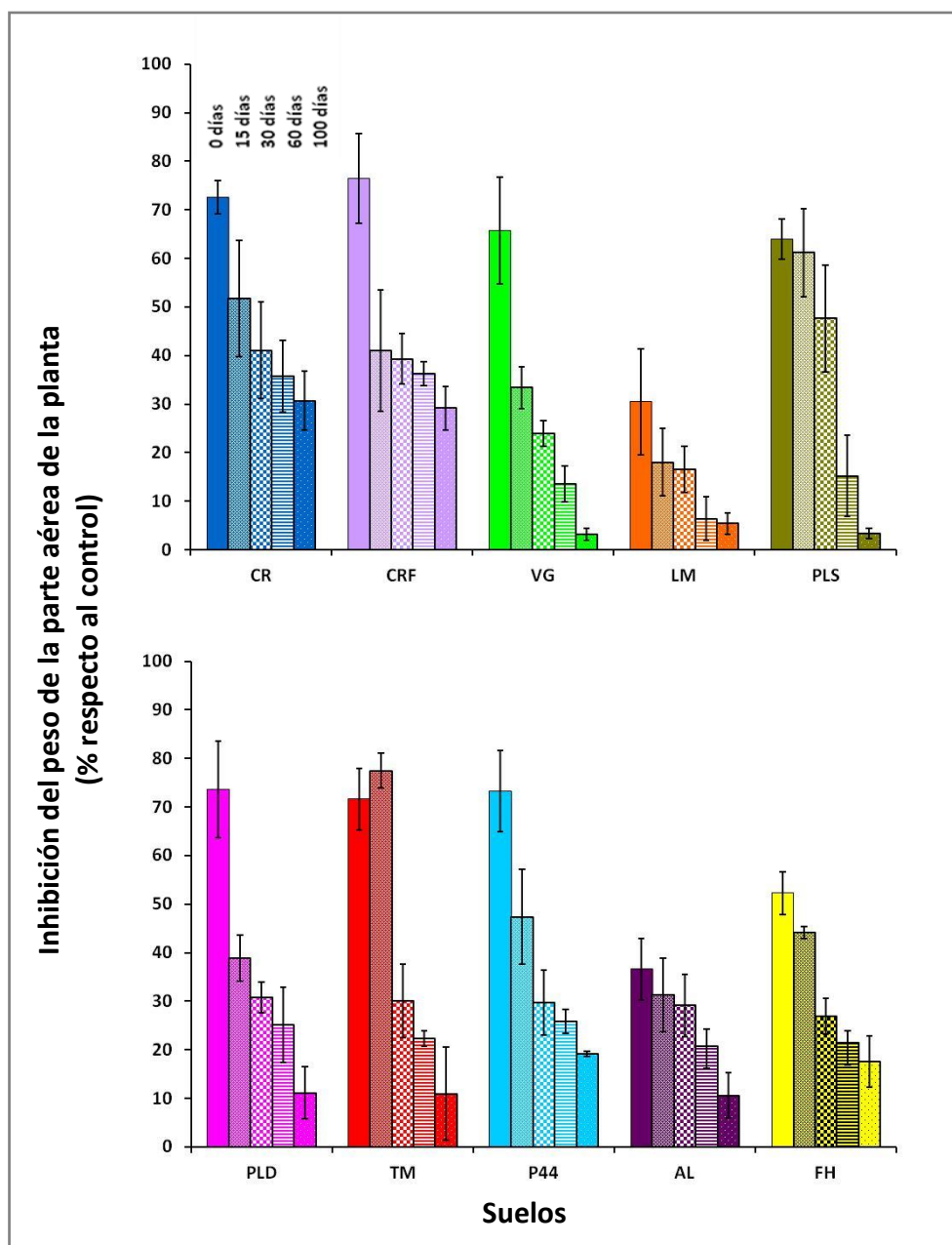


Figura 4.35. Porcentaje de inhibición del peso de la parte aérea de la planta estudiada en los 10 suelos previamente contaminados con Diurón (5 mg kg^{-1}) y dejados envejecer durante 0, 15, 30, 60 y 100 días.

Tabla 4.25. Porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD y CaCl_2 y porcentaje de inhibición del peso de la zona aérea de la planta a diferentes tiempos de envejecimiento en los 10 suelos estudiados. Concentración inicial de Diurón 5 mg kg^{-1} .

Suelos/ Tiempo de envejecimiento	% Extraído de Diurón				Inhibición peso (%)	Suelos/ Tiempo de envejecimiento	% Extraído de Diurón				Inhibición peso (%)
	BuOH	HPBCD	CaCl ₂				BuOH	HPBCD	CaCl ₂		
CR	0	84,3 (± 10,8)	84,2 (± 3,11)	19,2 (± 1,02)	72,6 (± 3,42)	PLD	0	63,0 (± 3,09)	29,1 (± 1,71)	7,97 (± 0,48)	73,7 (± 10,4)
	15	45,3 (± 8,02)	54,1 (± 2,11)	8,01 (± 0,84)	51,8 (± 12,4)		15	32,4 (± 1,42)	25,3 (± 1,82)	6,21 (± 2,45)	38,9 (± 4,81)
	30	31,5 (± 3,42)	55,6 (± 4,60)	6,92 (± 0,61)	41,1 (± 10,3)		30	54,9 (± 2,41)	22,9 (± 1,99)	4,57 (± 2,39)	30,7 (± 3,21)
	60	38,2 (± 4,10)	28,0 (± 4,78)	1,51 (± 0,03)	35,7 (± 7,45)		60	53,5 (± 6,31)	17,7 (± 7,13)	3,26 (± 2,24)	25,2 (± 7,84)
	100	12,6 (± 10,2)	22,1 (± 1,00)	1,05 (± 0,98)	30,7 (± 6,11)		100	41,3 (± 12,4)	13,4 (± 5,48)	1,62 (± 1,41)	11,1 (± 5,41)
CRF	0	91,2 (± 5,27)	49,6 (± 9,28)	17,8 (± 6,31)	52,3 (± 9,18)	TM	0	81,6 (± 2,41)	26,6 (± 1,72)	10,6 (± 1,18)	71,6 (± 6,35)
	15	82,8 (± 10,1)	49,2 (± 10,3)	17,1 (± 6,32)	44,2 (± 12,5)		15	67,7 (± 3,41)	22,6 (± 0,57)	5,84 (± 3,05)	77,5 (± 3,66)
	30	57,6 (± 7,02)	33,6 (± 11,7)	15,0 (± 8,57)	26,8 (± 5,21)		30	63,8 (± 6,11)	17,1 (± 0,56)	3,74 (± 1,11)	30,1 (± 7,61)
	60	39,3 (± 2,04)	20,3 (± 0,96)	12,8 (± 5,44)	21,5 (± 2,54)		60	50,2 (± 8,47)	15,8 (± 2,02)	3,64 (± 4,62)	22,3 (± 1,62)
	100	29,2 (± 1,10)	19,0 (± 0,49)	2,79 (± 2,63)	17,6 (± 4,51)		100	32,3 (± 7,42)	13,1 (± 0,31)	0,67 (± 0,12)	10,9 (± 9,57)
VG	0	99,3 (± 2,34)	23,9 (± 1,38)	8,86 (± 0,25)	65,7 (± 11,3)	P44	0	69,4 (± 10,4)	47,2 (± 5,60)	10,1 (± 1,20)	73,3 (± 8,45)
	15	67,5 (± 3,02)	22,5 (± 1,99)	3,34 (± 2,24)	33,4 (± 4,36)		15	56,8 (± 1,64)	25,3 (± 1,43)	9,10 (± 0,07)	47,4 (± 9,78)
	30	44,9 (± 2,22)	20,1 (± 0,48)	1,85 (± 1,12)	23,9 (± 2,61)		30	37,7 (± 9,04)	18,9 (± 0,39)	8,04 (± 3,11)	29,8 (± 6,67)
	60	33,4 (± 4,42)	18,6 (± 0,76)	1,13 (± 1,16)	13,6 (± 3,74)		60	33,2 (± 7,25)	21,2 (± 1,26)	1,74 (± 2,42)	25,9 (± 2,41)
	100	25,9 (± 1,06)	14,4 (± 2,13)	0,34 (± 0,09)	3,12 (± 1,21)		100	14,2 (± 8,46)	14,4 (± 0,33)	0,33 (± 0,03)	19,1 (± 0,53)
LM	0	96,5 (± 1,03)	30,5 (± 3,68)	14,8 (± 6,04)	30,5 (± 10,8)	AL	0	35,9 (± 6,14)	23,5 (± 2,46)	5,15 (± 0,50)	36,6 (± 6,48)
	15	66,5 (± 4,61)	27,0 (± 7,23)	10,3 (± 3,22)	18,0 (± 6,97)		15	34,8 (± 4,97)	23,0 (± 2,75)	4,15 (± 0,87)	31,3 (± 7,50)
	30	39,1 (± 6,52)	22,7 (± 2,26)	9,63 (± 2,51)	16,5 (± 4,81)		30	29,6 (± 8,26)	19,6 (± 0,93)	2,92 (± 0,84)	29,1 (± 6,41)
	60	18,9 (± 4,35)	19,1 (± 2,84)	7,58 (± 4,15)	6,38 (± 4,53)		60	15,5 (± 1,54)	19,9 (± 2,17)	2,32 (± 0,78)	20,8 (± 3,54)
	100	10,0 (± 5,26)	17,6 (± 0,72)	2,90 (± 2,23)	5,39 (± 2,27)		100	15,7 (± 4,64)	18,3 (± 0,75)	1,28 (± 0,05)	10,6 (± 4,62)
PLS	0	94,9 (± 0,52)	20,0 (± 1,55)	1,20 (± 0,39)	64,1 (± 4,15)	FH	0	70,4 (± 8,71)	19,5 (± 0,57)	8,75 (± 0,35)	76,4 (± 4,41)
	15	85,0 (± 6,32)	19,2 (± 1,45)	1,69 (± 0,22)	61,2 (± 9,14)		15	29,2 (± 4,32)	15,9 (± 3,25)	7,37 (± 0,67)	41,0 (± 1,22)
	30	68,7 (± 4,31)	16,6 (± 1,68)	1,50 (± 0,05)	47,7 (± 11,7)		30	26,8 (± 6,14)	10,6 (± 2,67)	6,73 (± 2,51)	39,3 (± 3,71)
	60	51,0 (± 2,14)	12,2 (± 4,73)	2,71 (± 0,75)	15,2 (± 8,45)		60	5,18 (± 5,64)	7,78 (± 2,46)	5,70 (± 1,34)	36,3 (± 2,64)
	100	39,7 (± 10,6)	7,71 (± 1,30)	3,92 (± 3,34)	3,34 (± 1,13)		100	5,15 (± 3,25)	6,23 (± 1,35)	5,46 (± 0,84)	29,2 (± 5,31)

4.8.2. Estimación del riesgo tóxico para cebada en presencia de Diurón envejecido en suelos

En primer lugar, en este apartado se realizaron experimentos de extracción en los mismos suelos que en el apartado 4.7.2 pero contaminados artificialmente en el laboratorio a una concentración inicial de 5 mg kg^{-1} (misma concentración que para los ensayos de ecotoxicidad para la cebada, apartado 4.8.1) y dejados envejecer durante distintos periodos de tiempo, tal como se expuso en el apartado 3.2.9.1 de Materiales y Métodos. En este estudio se emplearon los mismos extractantes que en las extracciones realizadas en el apartado 4.7.2 donde el herbicida se encontraba a una concentración de 50 mg kg^{-1} : una solución de CaCl_2 (10 mM), una solución HPBCD a una concentración 10 veces la concentración molar de Diurón y butanol. En segundo lugar, se obtuvieron correlaciones lineales entre el porcentaje inhibido del peso de la parte aérea del cultivo sembrado (*Hordeum vulgare*) y la fracción extraíble con los 3 extractantes empleados para llevar a cabo la estimación del riesgo tóxico para cebada en presencia de Diurón envejecido en el suelo.

En la Figura 4.36 se muestra el porcentaje extraído de Diurón con los 3 extractantes seleccionados a diferentes tiempos de envejecimiento. La extracción de Diurón es siempre más efectiva, cuando se usa butanol como extractante, presentando un alto porcentaje de extracción a tiempo 0, llegándose a alcanzar una extracción cercana al 100% en la mayoría de los suelos. Es de destacar el suelo AL donde sólo se logró extraer un 35,9% (Tabla 4.25). Estos datos se pueden correlacionar tanto con los resultados de adsorción-desorción (apartado 4.2.2), presentando este suelo una alta adsorción de Diurón y con los bioensayos realizados en el apartado anterior 4.8.1, dónde el porcentaje de inhibición del peso de la zona aérea de la planta de la cebada fue de solo 36,6% a tiempo 0 de envejecimiento (Tabla 4.25).

En general, las diferencias entre las cantidades extraídas del herbicida con butanol y con las soluciones de CaCl_2 y HPBCD resultan muy llamativas en la mayoría de los suelos (Figura 4.36), al contrario de lo que se observó cuando la concentración de Diurón en suelo era de 50 mg kg^{-1} , pues los porcentajes extraídos con butanol y HPBCD eran muy parecidos.

Con CaCl_2 , cuando el herbicida Diurón se aplica a 5 mg kg^{-1} , el porcentaje máximo que se logra extraer no supera el 20% de la cantidad inicialmente añadida (Figura 4.36 y Tabla 4.25). Es importante señalar que en las extracciones con solución de CaCl_2 el porcentaje de Diurón extraído es más o menos constante, independientemente del tiempo de envejecimiento para la mayoría de los suelos. Ello parece indicar que la adsorción de Diurón es rápida, debido a que dicha molécula es muy hidrofóbica y al ser la concentración del herbicida 10 veces menor que la estudiada anteriormente, la mayor parte de éste se quedará retenida en los puntos de adsorción

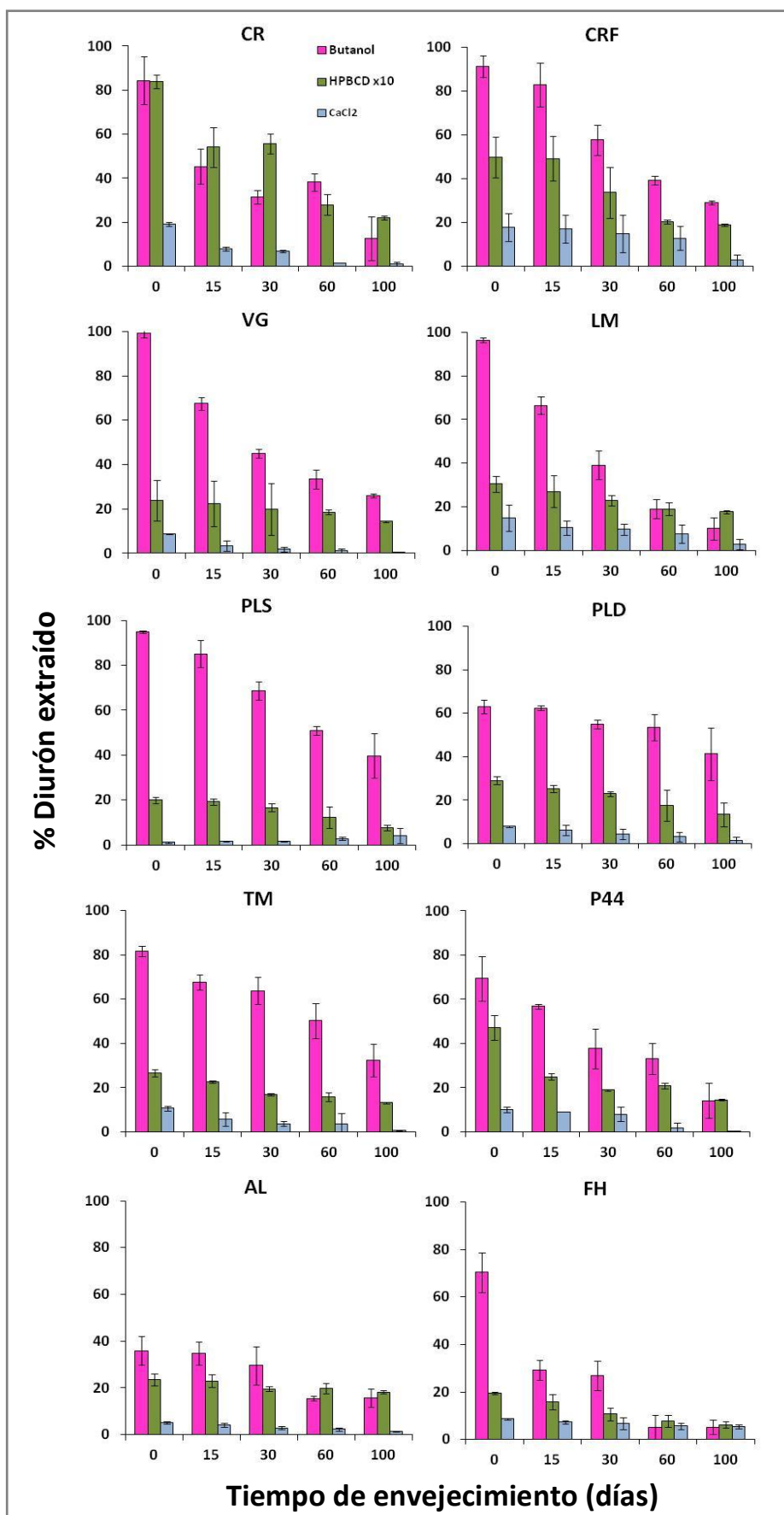


Figura 4.36. Porcentaje de Diurón extraído a partir de 3 extracciones no exhaustivas con butanol, solución de CaCl₂ y HPBCD x10, en los 10 suelos estudiados y contaminados a 5 mg kg⁻¹, después de 0, 15, 30, 60 y 100 días de envejecimiento.

de mayor energía principalmente, por lo que la cantidad extraída no variará a lo largo del tiempo y su fracción más disponible, es decir, aquella presente en la solución del suelo, permanece constante.

Comparando estas extracciones con las realizadas a 50 mg kg^{-1} (Figura 4.30, Tabla 4.24) se puede concluir que la extracción de Diurón es mucho más difícil, tanto con HPBCD como con CaCl_2 , cuanto menor es la concentración de Diurón presente en el suelo. Por otro lado, dada la heterogeneidad que presenta la MO de los suelos en general, existen componentes de la misma donde la adsorción de Diurón se da con mayor afinidad y de los cuales es más difícil su extracción, y otros componentes donde la afinidad de adsorción es más baja y se consigue una extracción más efectiva.

Se han propuesto correlaciones del porcentaje extraído con los tres extractantes no exhaustivos y los porcentajes de inhibición del peso de la parte aérea de la planta para predecir la toxicidad que puede presentar la presencia del herbicida Diurón en el suelo. Las correlaciones se muestran en la Figura 4.37a y b. Los datos de las 3 extracciones y el porcentaje inhibido del peso de la cebada *Hordeum vulgare* quedan reflejados en la Tabla 4.25.

En general, las correlaciones calculadas en los 10 suelos presentaron un R^2 comprendido entre 0,41-0,99. Como se comentó en el apartado de correlaciones entre las mineralizaciones y lo extraído a 50 mg Kg^{-1} (apartado 4.7.3) la información que aportan los coeficientes de correlación no permite establecer cuál es el agente extractante más idóneo para estimar el riesgo tóxico de Diurón hacia la planta. Por tanto, la pendiente y la intersección en el eje Y calculados a partir de una curva de regresión obtenida deben ser igualmente incluidas (Reid y col. 2000), las cuales serán estudiadas a fondo para los tres extractantes empleados.

Observando detalladamente las correlaciones obtenidas al emplear el extractante más exhaustivo de los 3 estudiados, butanol, se observa que dichas extracciones son las que están más cerca de simular el efecto tóxico hacia la planta (pendientes entre 0,29-2,20). Podríamos hablar de una subestimación de la toxicidad hacia la planta frente a los resultados de extracción en aquellos suelos donde la ecuación de la recta obtenida a partir de la correlación muestra una pendiente por encima a 1, lo que ocurre en los suelos PLS, PLD y TM. Pero también se observa una sobreestimación de la toxicidad por los resultados de la extracción en el caso de los suelos CR, CRF, VG, LM y FH.

En el caso de las cantidades de Diurón extraído cuando HPBCD x10 y CaCl_2 fueron usadas como extractantes, las pendientes fueron en general mayores de 1, lo que de manera general nos lleva a concluir que estas fracciones extraídas subestimaron el riesgo tóxico hacia la planta derivado de

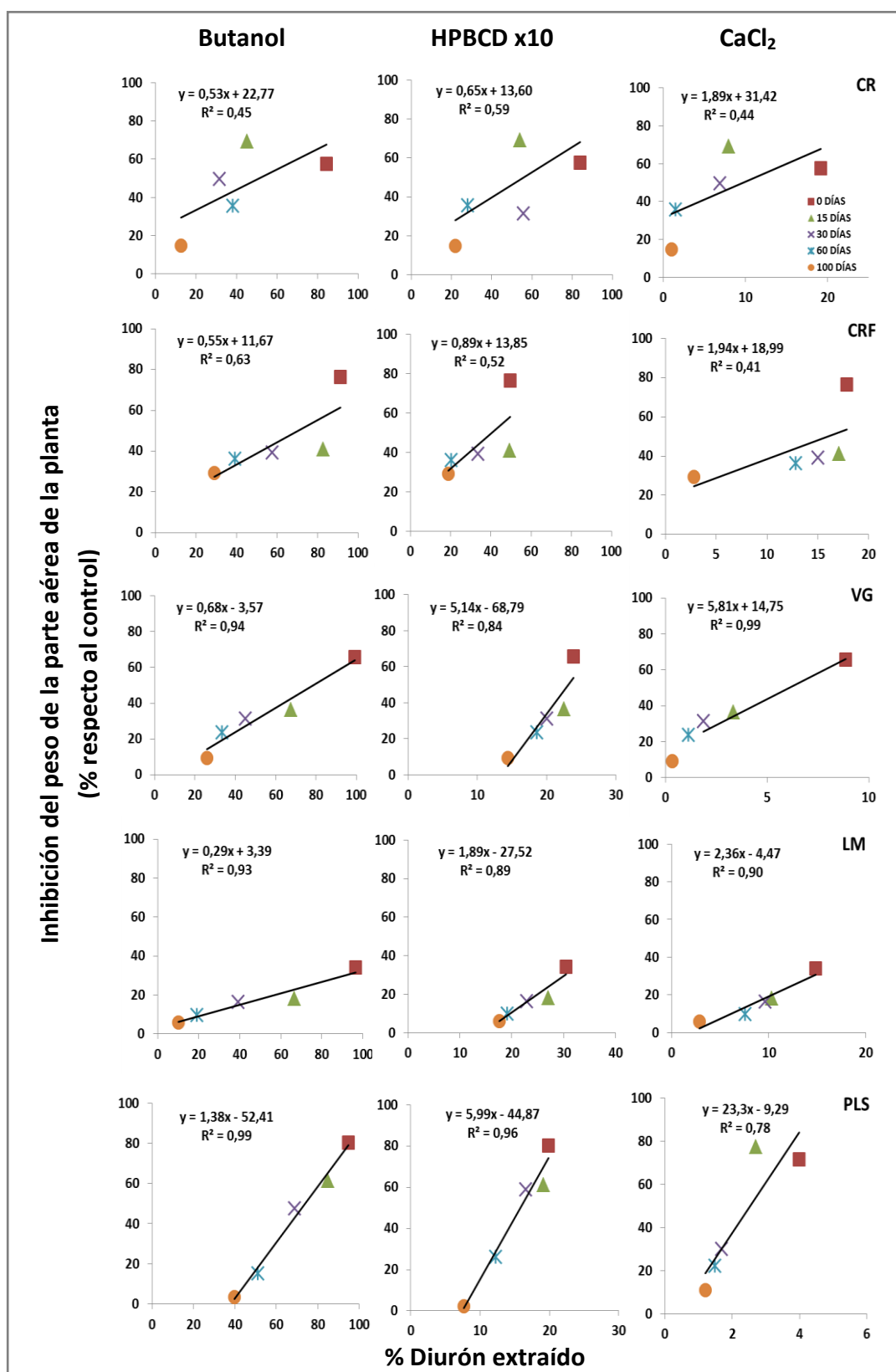


Figura 4.37a. Correlación entre el porcentaje de inhibición del peso de la cebada y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD x10 y CaCl_2 para los suelos CR, CRF, VG, LM y PLS después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (×), 60 (*) y 100 (●) días.

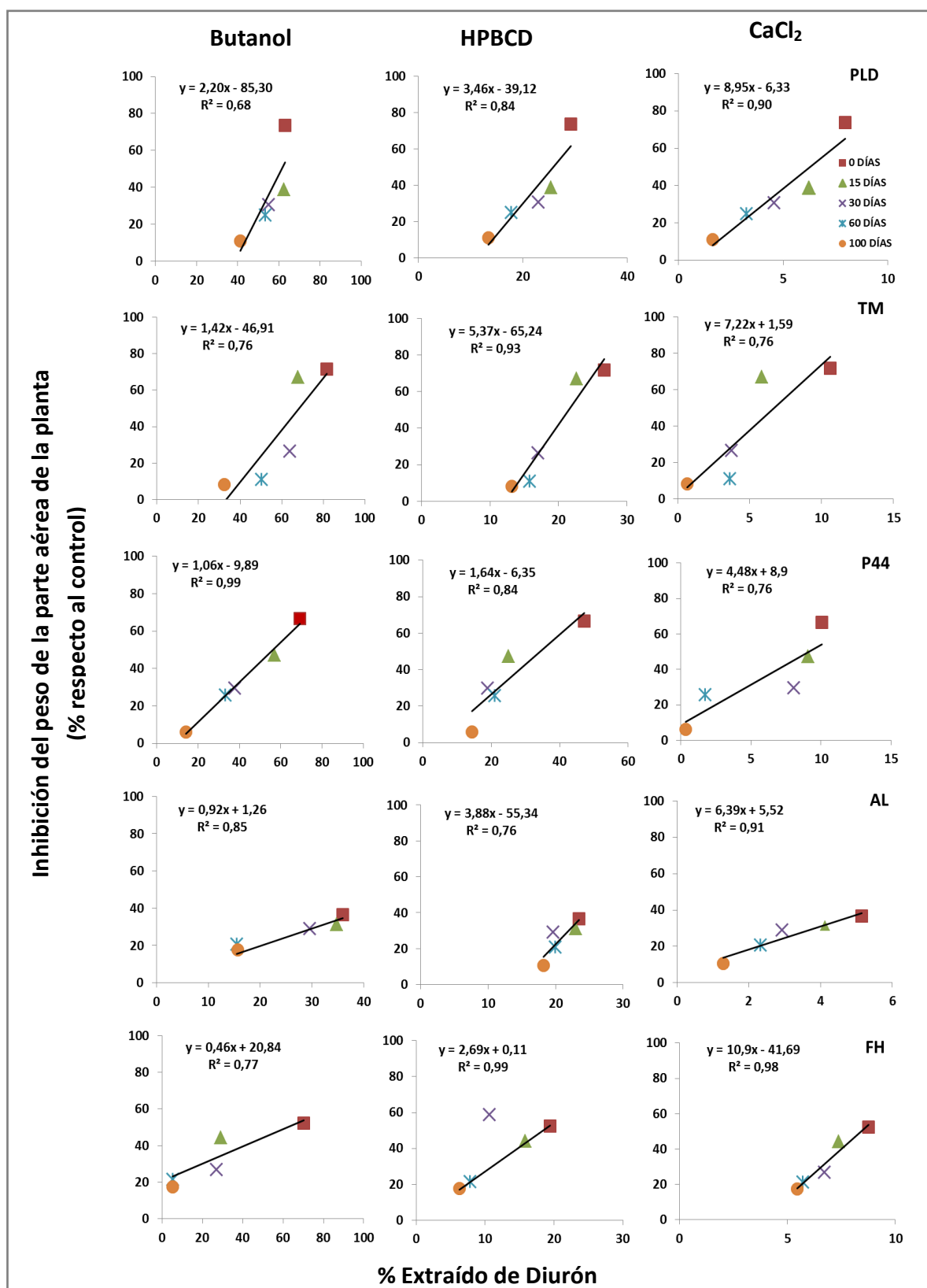


Figura 4.37b. Correlación entre el porcentaje de inhibición del peso de la cebada y el porcentaje de Diurón extraído con butanol, HPBCD x10 y CaCl₂ para los suelos PLD, TM, P44, AL y FH después de diferentes tiempos de envejecimiento: 0 (■), 15 (▲), 30 (×), 60 (*) y 100 (●) días.

la presencia de Diurón en el suelo. Las correlaciones obtenidas al emplear CaCl_2 como extractante fueron las que peores resultados presentaron. Las pendientes oscilaron entre 1,89-23,4 y las intersecciones entre -41,69 y 31,4 (Figura 4.37a y b y Tabla 4.25).

En resumen, el proceso de extracción en orden decreciente de los tres extractantes probados fue primero butanol, HPBCD x10 y CaCl_2 al igual que ocurría en las correlaciones realizadas con las mineralizaciones (4.7.3). Con estos resultados se podría considerar que la técnica de extracción no exhaustiva con butanol resulta ser la que más logra mimetizar el efecto tóxico de Diurón sobre la planta de cultivo investigada en las condiciones estudiadas para los 10 suelos seleccionados en esta memoria.

A modo global en la Figura 4.38 se representa la media de las extracciones con cada extractante respecto a la media de la inhibición del peso de la parte aérea de la planta de los 10 suelos estudiados y a todos los tiempos de envejecimiento investigados. Se observa de una manera más clara como la extracción con butanol, se aproximó mejor a mimetizar el riesgo tóxico de este herbicida en los suelos estudiados hacia las plantas de cebada, al igual que ocurrió en la correlación lineal global obtenida entre el porcentaje de Diurón mineralizado y las extracciones, a 50 mg kg^{-1} (apartado 4.7.3, Figura 4.32). Estudiar la biodisponibilidad de un contaminante es complejo y específico de cada organismo y especie empleada (Cachada y col. 2014). Además, encontrar un método de extracción que prediga y se correlacione con los bioensayos es difícil (ISO 17402:2011). El trabajo en laboratorio sobre la estimación del riesgo tóxico constituye solo una aproximación para entender el riesgo tóxico real de un contaminante en el suelo, ya que había que tener en cuenta también el efecto de los exudados de cada planta sobre el incremento de la biodisponibilidad del herbicida.

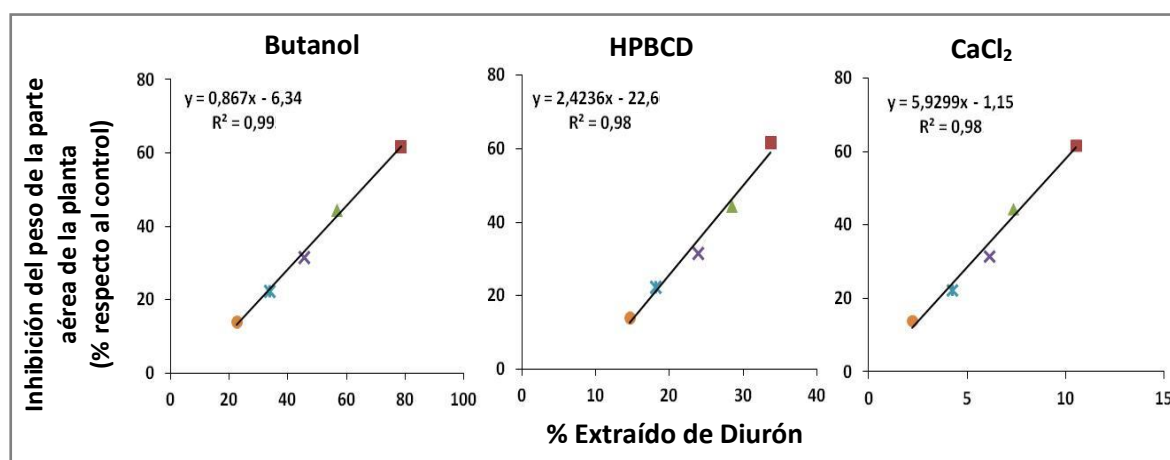


Figura 4.38. Correlación lineal global entre el porcentaje medio extraído y el porcentaje medio de inhibición del peso de la parte aérea de la cebada a diferentes tiempos de envejecimiento para cada extractante empleado.

4.8.3. Efecto del exudado de la cebada sobre la biodisponibilidad de Diurón

El hecho de que ninguna de las técnicas de extracción no exhaustivas logre conseguir una estimación más aproximada del riesgo tóxico real de contaminantes en el sistema suelo-agua es el resultado de la complejidad del propio sistema suelo-agua y de los múltiples y variados procesos que pueden tener lugar cuando se trabaja con suelos con una amplia variedad de propiedades. En nuestro caso el organismo que se estudia (planta de cultivo, *Hordeum vulgare*) para evaluar el efecto tóxico del contaminante posee mecanismos complejos relacionados con la asimilación del mismo y la bioacumulación a una concentración tóxica. La planta no solo contiene la información necesaria para la metabolización del herbicida, sino que al mismo tiempo activa procesos fisiológicos para su excreción de una manera activa y efectiva, de tal manera que sea capaz de transmitir la información en el lugar, momento y tiempo adecuado (Oliveros-Bastidas y col. 2009). No existen muchos artículos que se centren en el mecanismo de los exudados de la raíz de la planta para alterar abióticamente la biodisponibilidad de los contaminantes hidrófobos en la rizosfera. Los exudados contienen sustancias como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos y compuestos fenólicos los cuales hacen que incrementen la desorción de compuestos orgánicos hidrofóbicos (Bais y col. 2006; LeFevre y col., 2013). Es conocido que las plantas generan y excretan al sistema suelo-agua exudados a través de las raíces, que están principalmente constituidos por aniones de ácidos orgánicos alifáticos (carboxilatos) (Martín y col. 2014), carbohidratos y aminoácidos (Sun y col. 2013), que pueden provocar un aumento de la fracción biodisponible del contaminante. Los exudados de las raíces de las plantas juegan un papel importante en la degradación de contaminantes orgánicos (Joner y col. 2002). Estudios previos han demostrado que residuos no extraíbles de PAHs en suelos pueden ser absorbidos y acumulados por plantas (Han y col 2009) o por lombrices de la tierra (Gevao y col. 2001), indicando esto la importancia que presenta un estudio del exudado procedente de las raíces de plantas. Luo y col. (2006) estudiaron el efecto de los exudados de maíz y trigo en la desorción de DDT en 7 suelos observando una mejora frente a las desorciones sin los exudados para los suelos empleados.

Con el objetivo de poner de manifiesto esta propiedad y determinar el efecto de estos exudados sobre la biodisponibilidad del contaminante, inicialmente los exudados procedentes de la planta investigada fueron extraídos y aislados según se describe en la sección de Materiales y Métodos 3.2.9.2, para posteriormente ser empleados en experimentos de extracción de Diurón en 4 de los 10 suelos estudiados en la presente Memoria (CRF, PLD, AL, FH) y a diferentes tiempos de envejecimiento (0, 15, 30, 60 y 100 días). En la Figura 4.39 se representa el porcentaje de Diurón

extraído con el exudado procedente de la cebada, después de los tiempos de envejecimiento establecidos. Los porcentajes de Diurón extraídos se muestran en la Tabla 4.26.

Figura 4.39. Porcentaje de Diurón extraído con el exudado de las raíces de la planta (cebada), en los suelos CRF, PLD, AL y FH, contaminados a 5 mg kg^{-1} después de 0, 15, 30, 60 y 100 días de envejecimiento.

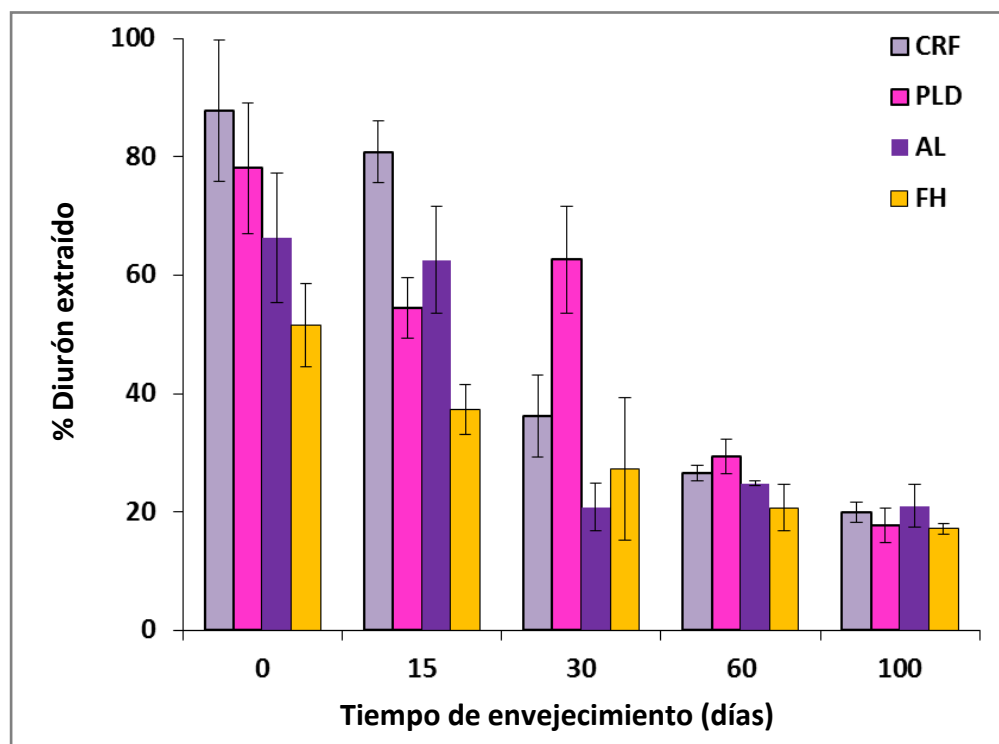


Tabla 4.26. Porcentaje de Diurón extraído con el exudado de la cebada y porcentaje inhibido del peso de la parte aérea de la cebada a diferentes tiempos de envejecimiento en los suelos CRF, PLD, AL y FH.

Suelos/Tiempo de envejecimiento	% Extraído con exudado	% Inhibición del peso	Suelos/Tiempo de envejecimiento	% Extraído con exudado	% Inhibición del peso
CRF 0	87,8 (± 12,0)	52,3 (± 9,20)	PLD 0	78,1 (± 11,0)	73,7 (± 10,0)
15	80,8 (± 5,20)	44,2 (± 12,4)	15	54,5 (± 5,11)	38,9 (± 4,82)
30	36,2 (± 6,94)	26,8 (± 5,20)	30	62,6 (± 9,10)	30,7 (± 3,20)
60	26,5 (± 1,28)	21,5 (± 2,50)	60	29,4 (± 3,12)	25,2 (± 7,81)
100	20,0 (± 1,74)	17,6 (± 4,50)	100	17,8 (± 2,97)	11,1 (± 5,40)
AL 0	66,3 (± 11,1)	36,6 (± 6,40)	FH 0	51,6 (± 7,02)	76,4 (± 4,45)
15	62,6 (± 9,40)	31,3 (± 7,52)	15	37,3 (± 4,17)	41,0 (± 1,22)
30	20,8 (± 4,22)	29,1 (± 6,44)	30	27,2 (± 12,1)	39,3 (± 3,78)
60	24,8 (± 0,43)	20,8 (± 3,54)	60	20,6 (± 3,92)	36,3 (± 2,54)
100	21,2 (± 3,57)	10,6 (± 4,61)	100	17,1 (± 0,88)	29,2 (± 5,26)

A partir del resultado obtenido en este apartado, se puede concluir que el exudado de la planta lograría aumentar la fracción biodisponible de Diurón capaz de resultar tóxica para la planta investigada. Los residuos de plaguicidas organoclorados pueden estar presentes en el suelo y ser adsorbidos por la planta de cultivo, incluso décadas después de las aplicaciones (Hilber y col.

2009). Otani y Seike, (2007) explican que en los pepinos y en otras plantas de la familia Cucurbitaceae es más fácil la adsorción de compuestos orgánicos persistentes del suelo que en otras especies.

En conclusión, queda de manifiesto como en los estudios encaminados a estimar el riesgo tóxico de un contaminante en el sistema suelo-agua deben estar claramente definidos, el tipo de contaminante, basándonos en su mecanismo de acción, y el organismo diana sobre el cual evaluar su toxicidad, ya que ésta dependerá de diferentes mecanismos entrecruzados que de manera indirecta pueden afectar sobre- o subestimando el riesgo tóxico real de un suelo contaminado.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. En el estudio comparativo de solubilidad de Diurón en presencia de las cinco CDs empleadas se pueden distinguir los siguientes aspectos:

1.1. Los estudios de interacción en medio acuoso Diurón-ciclodextrinas han mostrado que cuatro de las cinco ciclodextrinas empleadas, BCD, GCD, HPBCD y HPGCD, conducen a diagramas de solubilidad de tipo A_L de Higuchi y Connors, es decir, los complejos formados entre el plaguicida y estas CDs no poseen un límite de solubilidad definido, siendo el aumento de solubilidad consecuencia de la formación de un complejo de inclusión entre el herbicida Diurón y las diferentes CDs empleadas. El hecho de que los diagramas sean líneas rectas con pendientes menores a 1 indica que los complejos formados en solución presentan una estequiometría 1:1. En el caso de la ciclodextrina RAMEB, se observó un diagrama de tipo B_S de Higuchi y Connors, indicando que el complejo formado en solución posee un límite de solubilidad.

1.2. El cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos Diurón-ciclodextrinas obtenidos en medio acuoso ha puesto de manifiesto la siguiente secuencia RAMEB>HPBCD>BCD>HPGCD>GCD. Estos resultados confirman la importancia de la dimensión de la cavidad de la ciclodextrina en el proceso de complejación del herbicida. Con los cálculos del modelo de complejación molecular empleando el servicio web "Cyclodextrin KnowledgeBase" se corroboran dichos resultados.

2. En la adsorción de Diurón sobre los componentes coloidales seleccionados, se observó una mayor capacidad de adsorción por parte de los ácidos húmicos, seguido a gran distancia por el mineral de la arcilla montmorillonita. La adsorción sobre el óxido de hierro sintético goetita fue prácticamente nula. Los experimentos de desorción de Diurón sobre los componentes coloidales, usando una solución acuosa 0,01 M de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ como extractante, indicaron una mayor irreversibilidad (menor porcentaje de desorción) cuanto menor fue la cantidad de Diurón que se encontraba adsorbida, es decir, la molécula de Diurón estaba más fuertemente adsorbida a los puntos de adsorción de alta energía y su desorción, resultó ser más difícil. El porcentaje de desorción con montmorillonita fue más mucho alto que con los ácidos húmicos a las diferentes concentraciones empleadas, indicando esto que en suelos con bajo contenido en MO y en presencia de minerales de la arcilla puede ser más fácil la pérdida de Diurón provocando en aumento de la contaminación ambiental.

3. De los resultados derivados del estudio de adsorción-desorción de Diurón sobre diversos suelos se concluye:

3.1. Las isothermas de adsorción de Diurón en suelos con diferentes propiedades físico-químicas se ajustaron a la ecuación de Freundlich, como se confirma a partir de los coeficientes de correlación calculados. El estudio estadístico de correlaciones bivariadas obtenidas para las distintas propiedades de los suelos estudiados indicó que la adsorción del herbicida Diurón no solo dependió del contenido en materia orgánica de los suelos, sino también del contenido en óxidos amorfos totales.

3.2. Las desorciones de Diurón con solución de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0,01 M y con solución de HPBCD x10 (10 veces la concentración molar del herbicida aplicado) se correlacionaron negativamente con la constante de adsorción de Freundlich, K_f , es decir, cuando el suelo presentó una alta capacidad de adsorción por el herbicida éste mostró una mayor resistencia a ser desorbido. Así mismo, ambas desorciones se correlacionan negativamente con el contenido en MO, y sólo la desorción con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ fue afectada negativamente por la presencia de MnO amorfos. Las desorciones del herbicida Diurón resultaron ser siempre más efectivas en presencia de HPBCD.

4. A partir de la realización de experiencias de lixiviación de Diurón en columnas de suelo se concluye:

4.1. En la curva de elución del herbicida a través de un suelo franco limoso con un contenido en MO mayor del 3% se determinó un porcentaje de elución muy bajo (6,65%). Sin embargo, para un suelo arenoso con un contenido en MO menor del 1% se observó una importante lixiviación (73,5%), debido al bajo contenido en MO y a su alta porosidad.

4.2. Al emplear HPBCD x10 en los estudios de lixiviación, no se observaron diferencias significativas para los dos suelos empleados en comparación con la lixiviación en ausencia de HPBCD. Los residuos de Diurón extraídos con metanol de las columnas en el suelo arenoso presentaron una distribución homogénea del herbicida a lo largo de toda la columna. En cambio, para el suelo franco limoso con un alto contenido en MO la mayor parte de Diurón quedó retenida especialmente en el primer anillo de la columna.

4.3. Aunque la concentración de HPBCD aplicada resultó no provocar un incremento en la capacidad de lixiviación de Diurón en ambos suelos, sí se consiguió aumentar la

biodisponibilidad del herbicida en el suelo FH, provocando una mejora significativa en la biodegradación del herbicida.

5. Las conclusiones que se derivan de los estudios de bioestimulación de suelos contaminados con Diurón son las siguientes:

5.1. La atenuación natural del herbicida Diurón no resultó posible en ninguno de los 10 suelos estudiados, siendo necesario el empleo de técnicas de bioestimulación a través del empleo de una solución de nutrientes para activar tanto la flora autóctona del propio suelo, como también la flora exógena inoculada en los ensayos de bioaumentación.

5.2. El empleo de enmiendas orgánicas como bioestimulantes provocó mejoras significativas en la mineralización del herbicida Diurón, tanto desde un punto de vista cuantitativo, aumentándose la cantidad global mineralizada, como cinético, consiguiéndose una reducción de la fase lag y de la DT_{50} , siendo estos parámetros de vital importancia a la hora de tomar la decisión de aplicar una estrategia de biorrecuperación *in situ* de un suelo contaminado.

6. Las conclusiones que se derivan de los estudios de bioaumentación de suelos contaminados por Diurón son las siguientes:

6.1. Los consorcios bacterianos C1, C2, C3, C4 y C5, previamente aislados de 5 de los suelos estudiados no solo confirmaron ser degradadores específicos de Diurón, sino que además eran capaces de llegar a mineralizar el herbicida pudiendo ser utilizados como bioaumentadores en procesos de biorrecuperación.

6.2. El consorcio bacteriano obtenido a partir de 3 cepas degradadoras específicas de Diurón, formado por *A. sulfonivorans* (adquirida de la Colección del Instituto Pasteur), *V. soli* (proporcionada por el Doctor Sebastian Sorensen, del Instituto "Geological Survey of Denmark and Greenland", GEUS) y *A. kashmirensis* (previamente aislada e identificada en nuestros laboratorios y procedente de un suelo contaminado por derivados del petróleo, hidrocarburos clorados y ftalatos) fue capaz de mineralizar en medio líquido el 99,8% de Diurón con una fase lag de sólo 2 días. Al aplicar este consorcio bacteriano a una suspensión de suelo contaminado por Diurón, se llegó a alcanzar una extensión global de mineralización que osciló entre 60 y 99% en los 10 suelos estudiados. La aplicación conjunta de las tres cepas forma un consorcio extraordinario, ya que se consigue eliminar de manera completa tanto el herbicida como sus metabolitos, evitando así la presencia en el suelo de

compuestos intermedios relativamente persistentes y que pudieran ser aun más contaminantes que la propia molécula de Diurón.

7. Las conclusiones que se derivan del análisis de ADN de las tres cepas degradadoras específicas empleando la técnica de PCR mostraron la presencia de los genes que codifican la síntesis de enzimas implicadas en la ruta de mineralización del herbicida Diurón: en *A. sulfonivorans*, Puh A y dcaQ; en *A. kashmirensis*, Lib A y dcaQ; y en *V. soli*, Lib A, dcaQ y ccdC. El gen ccdC presente en *V. soli* es de vital importancia por ser el responsable de codificar la enzima clorocatecol dioxigenasa capaz de romper el anillo aromático del herbicida Diurón y provocar su mineralización.

8. La determinación por microscopía de epifluorescencia de la supervivencia del consorcio bacteriano degradador específico de Diurón (*A. sulfonivorans*, *A. kashmirensis* y *V. Soli*), corroboró su viabilidad a lo largo de todo el tiempo del ensayo de mineralización en medio líquido, permaneciendo activas el 69,4% de las cepas bacterianas respecto al 28,6% del ensayo control sin Diurón. La elevada tasa de supervivencia del consorcio pone de manifiesto su capacidad de usar Diurón como única fuente de carbono para su crecimiento.

9. La efectividad de las técnicas de biorrecuperación de suelos contaminados con Diurón empleadas en sistemas dinámicos de suelos en suspensión fue confirmada en sistemas estáticos con solo el 40% de humedad en el suelo, más cercanos a un escenario real de suelos contaminados, obteniéndose una mejora significativa de los parámetros cinéticos de mineralización de Diurón respecto a la capacidad de atenuación natural de los suelos estudiados. Se concluye que, tanto en un sistema dinámico como estático es recomendable el empleo de las técnicas de biorrecuperación de suelos investigadas en esta memoria en conjunto, siendo necesaria la bioestimulación de la flora autóctona con solución de nutrientes, la bioaumentación del sistema con consorcios degradadores específicos del herbicida y, el empleo de agentes complejantes tales como HPBCD para hacer más biodisponible al herbicida.

10. A partir de la evaluación de la biodisponibilidad de Diurón en suelos contaminados y envejecidos, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

10.1. El envejecimiento de Diurón en los suelos estudiados quedó patente cuando se llevaron a cabo extracciones no exhaustivas con butanol, HPBCD, CaCl_2 a diferentes tiempos de envejecimiento, observándose una significativa reducción en la cantidad extraída del mismo a medida que se incrementaba el tiempo de envejecimiento. Las moléculas del

herbicida quedan más fuertemente asociadas al suelo debido a los procesos de difusión a través de los microporos del mismo y a su interacción con puntos de adsorción de mayor energía. Las extracciones no exhaustivas a diferentes tiempos de envejecimiento del herbicida Diurón en orden decreciente fueron: Butanol > HPBCD > CaCl₂. La cantidad global mineralizada también puso de manifiesto cómo el envejecimiento disminuye la biodisponibilidad del herbicida para las cepas degradadoras específicas.

10.2. Las correlaciones obtenidas entre la cantidad total de Diurón mineralizado y extraído empleando diferentes extractantes no exhaustivos a diferentes tiempos de envejecimiento en los suelos estudiados, mostraron que el extractante butanol fue el que más se aproximó a simular los mecanismos que gobiernan la biodisponibilidad del contaminante hacia microorganismos degradadores específicos, pudiendo proporcionar una técnica fiable para estimar la fracción biodisponible del herbicida Diurón en el suelo.

11. A partir de los estudios para la estimación del riesgo tóxico de Diurón envejecido en suelos contaminados se concluye:

11.1. El estudio de bioecotoxicidad de Diurón en suelos a una aplicación de 5 mg kg⁻¹ (equivalente a 5 kg ha⁻¹) mostró cómo el porcentaje de inhibición en el crecimiento de la zona aérea de una planta de cebada (*Hordeum vulgare*) decrece a medida que aumenta el tiempo de envejecimiento.

11.2. Las correlaciones obtenidas entre el porcentaje de inhibición en el crecimiento de la planta de cebada y la cantidad extraída mediante el empleo de extractantes no exhaustivos mostraron que la técnica de extracción con butanol consigue una mayor aproximación a mimetizar el riesgo tóxico del contaminante hacia el organismo superior diana investigado.

11.3. Con los experimentos de extracción de Diurón empleando el exudado de la raíz de la planta de cebada como extractante se confirmó la capacidad de la propia planta para aumentar la fracción biodisponible del herbicida en el suelo, provocando esto una mayor inhibición del crecimiento de la parte aérea de la planta.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

Aburto, A., Fahy, A., Coulon, F., Lethbridge, G., Timmis, K.N., Ball, A.S., McGenity, T.J. "Mixed aerobic and anaerobic microbial communities in benzene-contaminated groundwater". *Journal of Applied Microbiology*, 106 (1), 317-328 (2009).

Aburto-Medina, A., Adetutu, E.M., Aleer, S., Weber, J., Patil, S.S., Sheppard, P.J., Ball, A.S., Juhasz, A.L. "Comparison of indigenous and exogenous microbial populations during slurry phase biodegradation of long-term hydrocarbon-contaminated soil". *Biodegradation*, 23, 813-822 (2012).

Acar, Y.B., Rabbi, M.F., Ozsü, E.E. "Electrokinetic injection of ammonium and sulfate ions into sand and kailinite beds". *Journal Geotechnical and Geoenvironmental Engineering*, 123, 239-249 (1997).

Alexander, M. "How toxic are toxic-chemicals in soil". *Environmental Science and Technology*, 29 (11), 2713-2717 (1995).

Alexander, M. Ed. "Biodegradation and Bioremediation". Second Edition, San Diego, California 92101-4495, USA. ISBN-13: 978-0-12-049861-1 (1999).

Alexander, M., Scow, K.M. "Kinetics of biodegradation in soil". In *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*, 243-269 (1989).

Alexander, M., Scow, K.M. "Kinetics of biodegradation in soil". In *Reactions and Movement of Organic Chemical in Soil*, 243-269 (1986).

Alkhatib, E., Weigand, C. "Parameters affecting partitioning of 6 PCB congeners in natural sediments". *Environmental Monitoring and Assessment*, 78 (1), 1-17 (2002).

Allan I.J., Semple K.T., Hare R., Reid, B.J. "Cyclodextrin enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols in contaminated soil slurries". *Environmental Science & Technology*, 41, 5498-5504 (2007).

Allan, I.J., Semple, K.T., Hare, R., Reid, B.J. "Prediction of mono- and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in spiked soils using cyclodextrin extraction". *Environmental Pollution*, 44, 562-571 (2006).

Andrades, M.S., Rodríguez-Cruz M.S., Sánchez-Martín M.J., Sánchez-Camazano M. "Effect of the addition of wine distillery wastes to vineyard soils on the adsorption and mobility of fungicides". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3022-3029 (2004).

Andrades, M.S., Sánchez-Martín M.J., Sánchez-Camazano M. "Significance of soil properties in the adsorption and mobility of the fungicide metalaxyl in vineyard soils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5), 2363-2369 (2001).

Anexo III del Reglamento (CE) 1185/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 25 de noviembre de 2009 relativo a las estadísticas de plaguicidas.

Arfaoui, A. E., Sayen, S., Paris, M., keziou, A., Couderchet, M., Guillon, E. "Is organic matter alone sufficient to predict isoproturon sorption in calcerous soils?". *Science of the Total Environment* 432, 251-256 (2012).

Atlas, R.M., Philips, J. Ed. "Bioremediation. Applied Microbial Solutions for Real*World Environmental Cleanup". *American Society for Microbiology*, Washington, DC 20036-2904 (2005).

Attaway, H.H., Schmidt, M.G. "Tandem biodegradation of BTEX components by two *Pseudomonas* sp". *Current Microbiology*, 45 (1), 30-36 (2002).

Badr, T., Hanna, K., de Brauer, C., "Enhanced solubilization and removal of naphthalene and phenanthrene by cyclodextrins from two contaminated soils". *Journal of Hazardous Materials*, 112 (3), 215-223 (2004).

Baggi, G., Cavalca, L., Francia, P., Zangrossi, M. "Chlorophenol removal from soil suspensions: effects of a specialised microbial inoculum and a degradable analogue". *Biodegradation*, 15, (3) 153-160 (2004).

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. "The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms". *Annual Review Plant of Biology*, 57, 233-266 (2006).

Bardi, L., Martini, C., Opsi, F., Bertolone, E., Belviso, S., Masoero, G., Marzona, M., Ajmone, F. "Cyclodextrin-enhanced in situ bioremediation of polyaromatic hydrocarbons-contaminated soils and plant uptake". *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 439 – 444 (2007).

Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S., Marzona, M. "Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β - ciclodextrin as surfactant to enhance bioavailability". *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 709 – 713 (2000).

Barhoumi, M., Beurroies, I., Denoyel, R., Said, H., Hanna, K. "Coadsorption of phenol and nonionic surfactants onto clays". *Colloids and Surfaces* 223, 1-3 (2003).

Barnier, C., Ouvrard, S., Robin, C., Morel, J.L. "Desorption kinetics of PAHs from aged industrial soils for availability assessment". *Science of the Total Environmental*, 470-471, 639-645 (2014).

Barracough, D., Kearney, T., Croxford, A. "Bound residues: environmental solution or future problem?". *Environmental Pollution*, 133, 85-90 (2005).

Barriuso, E., Houot, S., Serra-Wittling, C. "Influence of compost addition to soil on the behavior of herbicide". *Pesticide Science*, 49, 65-75 (1997).

Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., Diels, L. "Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers". *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1834-1843 (2000).

Bending, G.D., Rodriguez-Cruz, M.S. "Microbial aspects of the interaction between soil depth and biodegradation of the herbicide isoproturon". *Chemosphere*, 66 (4), 664-671 (2007).

- Bending, G.D., Rodríguez-Cruz, M.S., Lincoln, S.D. "Fungicide impacts on microbial communities in soils with contrasting management histories". *Chemosphere*, 69, (1), 82-88 (2007).
- Benfeito, S., Rodrigues, T., Garrido, J., Borges, F., Garrido, E.M. "Host-guest interaction between herbicide oxadiargyl and hydroxypropil- β -cyclodextrin". *The Scientific World Journal*, ID 8252066 (2013).
- Bento, F.M., Camargo, F.A.O., Okeke, B.C., Frankenberger, W.T. "Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation". *Bioresource Technology*, 96, 1049-1055 (2005).
- Berendsen, H.J.C., Van der Spoel, D., Van Drunen, R. "GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation". *Computer Physics Communications* 91, 43 (1995).
- Bernhardt, C., Derz, K., Kördel, W., Tertytze, K. "Applicability of non-exhaustive extraction procedures with Tenax and HPBCD". *Journal of Hazardous Materials*, 261, 711-717 (2013).
- Bers, K., Leroy, B., Breugelmans, P., Albers, P., Lavigne, R., Sorensen, S.R., Aamand, J., De Mot, R., Wattiez, R., Springael, D. "A Novel Hydrolase Identified by Genomic-Proteomic Analysis of Phenylurea Herbicide Mineralization by *Variovorax* sp. Strain SRS16". *Applied and Environmental Microbiology*, 8754-8764 (2011).
- Bikádi, Z., Kurdi, R., Balogh, S., Szemán, J., Hazai, E. "Aggregation of cyclodextrins as an important factor to determine their complexation behavior". *Chemistry and Biodiversity*, vol. 3, 1266-1278 (2006).
- Blumhorst, M.R., Weber, J.B. "Cyanazine dissipation as influenced by soil properties". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 894-897 (1992).
- Bonaventura, C. y Johnson F.M. "Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow". *Environmental Health Perspectives*, 105 (1), 5-20 (1997).
- Borggard, O.K., Streibig, J.C. "Chlorsulfuron adsorption by humic acid, iron oxides, and montmorillonite". *Weed Science*, 36, 530-534 (1988).
- Borodina, E., Kelly, D.P., Schumann, P., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L., Wood, A.P. "Enzymes of dimethylsulfone metabolism and the phylogenetic characterization of the facultative methylotrophs *Arthrobacter sulfonivorans* sp. nov., *Arthrobacter methylotrophus* sp. nov., and *Hyphomicrobium sulfonivorans* sp. nov." *Archives Microbiology*, 177, 173-183 (2002).
- Bouwer, E.J., Durant, N.D., Wilson, L.P., Zhang, W. "Design considerations for in situ bioremediation of organic contaminants". In: Lewandowski, G.A., and DeFilippi, L.J., (Eds), *Biological Treatment of Hazardous Waste*. John Wiley and Sons, Inc. New York, 237-269 (1998).
- Boving, T.B., Brusseau, M.L., "Solubilization and removal of residual trichloroethene from porous media: comparison of several solubilization agents". *Journal of Contaminant Hydrology*, 42, 51-67 (2000).
- Breitung, J., Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Kaminski, L., Gemsa, D., von Low, E. "Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 795-800 (1996).

- Breugelmans, P., Leroy, B., Bers, K., Dejonghe, W., Wattiez, R., De Mot, R., Springael, D. "Proteomic study of linuron and 3,4-dichloroaniline degradation by *Variovorax* sp. WDL1: evidence for the involvement of an aniline dioxygenase-related multicomponent protein". *Research in Microbiology*, 161, 208-218 (2010).
- Budzinski, H., Raymond, N., Nadalig, T., Gilewicz, M., Garrigues, P., Bertr, J.C., Caumette, P. "Aerobic biodegradation of alkylated aromatic hydrocarbons by a bacterial community". *Organic Geochemistry*, 28, 337-348 (1998).
- Cabrera, A., Cox, L., Koskinen, W.C. "Availability of triazine herbicides in aged soils amended with olive oil mill waste". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4112-4119 (2008).
- Cachada, A., Pereira, R., Ferreria da Silva, E., Duarte, A.C. "The prediction of PAHs bioavailability in soils using chemical methods: state of the art and future challenges". *Science of the Total Environment*, 472, 463-480 (2014).
- Cai, X.Y., Liu, W.P., Chen, S.W. "Environmental effects of inclusion complexation between methylated betacyclodextrin and diclofop-methyl". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (17), 6744-6749 (2005).
- Calvet, R. "Adsorption of organic chemicals in soils" (Review). *Environmental Health Perspectives*, 83, 145-177 (1989).
- Caracciolo, A.B., Bottoni, P., Grenni, P. "Microcosm studies to evaluate microbial potential to degrade pollutants in soil and water ecosystems". *Microchemical*, 107, 126-130 (2013).
- Carbo, L., Martins, E.L., Dores, E.F.G.C., Spadotto, C.A., Weber, O.L.S., De-Lamonica-Freire, E.M. "Acetamiprid, carbendazim, diuron and thiamethoxam sorption in two brazilian tropical soils". *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42, 499-507 (2007).
- Carter A.D. "Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes". *Weed Research*, 40, 133-122 (2000).
- Casellas, M., Grifoll, M., Sabaté, J., Solanas, A.M. "Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorine by a consortium". *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 734-742 (1998).
- Castelo-Grande, T., Augusto, P.A., Monteiro, P., Estevez, A.M., Barbosa, D. "Remediation of soils contaminated with pesticide: a review". *International of Journal Analitics Chemistry*, 90 (3-6), 438-467 (2010).
- Chang, T.C., Yen, J.H. "On site mercury contaminated soils remediation by using thermal desorption technology". *Journal of Hazardous Materials*, 128 (2-3), 208-217 (2006).
- Chapell, M.A., Laird, D.A., Thompson, M.L., Evangelou, V.P. "Cosorption of atrazine and lauryl polyoxyethylene oxide nonionic surfactant on smectite". *Journal Agricultural and Food Chemistry* 53, 10127-10133 (2005).
- Charoenchaitrakool, M., Dehghani, F., Foster, N.R. "Utilization of supercritical carbon dioxide for complex formation of ibuprofen and methyl-cyclodextrin". *International Journal of Pharmaceutics*, 239, 103 – 112 (2002).

- Cheng H. "Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling". *Soils Science Society of America*, Madison, WI (1990).
- Chung, N., Alexander, M. "Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils". *Environmental Science & Technology*, 32, 855-860 (1998).
- Claver, A., Ormad, P., Rodríguez, L., Ovelleiro, J.L. "Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain)". *Chemosphere*, 64 (99), 1437-1443 (2006).
- Clegg, H., Riding, M. J., Oliver, R., Jones, K.C., Semple, K. T. "The impact of soil organic matter and soil sterilisation on the bioaccessibility of ¹⁴C-azoxystrobin determined by desorption kinetics". *Journal of Hazardous Materials*, 278, 336-342 (2014).
- Clemente, R., Walker, D.J., Bernal, M.P. "Uptake of heavy metals and As by Brassica juncea grown in a contaminated soil in Aznalcóllar (Spain): the effect of soil amendments". *Environmental Pollution*, 138 46-58 (2005).
- Coenye, T., Vanlaere, E., Samyn, E., Falsen, E., Larsson, P., Vandamme, P. "Advenella incanta gen., sp. nov. A novel member of the Alcaligenaceae isolated from various clinical samples". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55 (1), 251-256 (2005).
- Conte, P., Agretto, A., Spaccini, R., Piccolo, A. "Soil remediation: humic acids as natural surfactants in the washings of highly contaminated soils". *Environmental Pollution*, 135, 515-522 (2005).
- Cornelissen, G., Gustafsson, O., Bucheli, T.D., Jonker, M.T.O., Koelmans, A.A., Van Noort, P.C.M. "Extensive sorption of organic compounds to black carbon, coal and kerogen in sediments and soils: Mechanisms and consequences for distribution, bioaccumulation, and biodegradation". *Environmental Science & Technology*, 39, 6881 – 6895 (2005).
- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandi, M.M.A., Van Nort, P.C.M. "Rapidly Desorbing Fractions of PAHs in Contaminated Sediments as a Predictor of the Extent of Bioremediation". *Environmental Science and Technology*, 32, 966-970 (1998).
- Cox, L., Fernandes, M.C., Zsolnay, A., Hermosín, M.C., Cornejo, J. "Changes in dissolved organic carbon of soil amendments with aging: Effect on pesticide adsorption behavior". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5635-5642 (2004).
- Cox, L., Hermosín, M.C., Cornejo, J., Mansour M. "Photolysis of metatoltrien in water in the presence of soils and soil components". *Chemosphere*, 33, 2057-2064 (1996).
- Crampon, M., Bureaur, E., Akpa-Vinceslas, M., Bodilis, J., Machour, N., LeDerf, E., Portet-Koltalo, E. "Correlations between PAH bioavailability, degrading bacteria, and soil characteristics during PAH biodegradation in five diffusely contaminated dissimilar soils". *Environmental Science Pollutant Research*. DOI 10.1007/s11356-014-2799-6 (2014).
- Critto, A., Torresan, S., Semenzin, E., Giove, S., Mesman, M., Schouten, A.J., Rutgers, M., Marcomini, A. "Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: Part I. A multi-criteria based system for the selection of ecotoxicological tests and ecological observations. *Science of the Total Environment*, 379, 16-33 (2007).

Cserhati, T., Forgaes, E., oros, G. "Biological activity and environmental impact of anionic surfactants". *Environment International*, 28, 337-348 (2002).

Cullington, J.E. y Walker, A. "Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium". *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 677-686 (1999).

Cunningham, S.D., Berti, W.R. "Remediation of contaminated soils with green plants: an overview". *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 29, 207-212 (1993).

Cuypers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and Triton X-100 extraction techniques. *Chemosphere*, 46 (8), 1235-1245 (2002).

Cyclodextrin KnowledgeBase (<http://www.cyclodextrin.net>). Último acceso 11-04-2014.

De Carvalho, C.C.C.R., Da Fonseca, M.M.R. "Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis* DCL14". *FEMS Microbiology Ecology*, 51 (3), 389-399 (2005).

De Jesus, M.B., Pinto, L.D.M.A., Fraceto, L.F., Takahata, Y., Lino, A.C.S., Jaime, C., de Paula, E. "Theoretical and experimental study of a praziquantel and beta-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and H-1-nuclear magnetic resonance". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1428-1432 (2006).

Dejonghe, W., Bertheloot, E., Goris, J., Boon, N., Crul, K., Maertens, S., Höfte, M., De Vos, P., verstraete, W., Top, E.M. "Synergistic degradation of Linuron by a bacterial consortium and isolation of a single Linuron-degrading *Variovorax* strain". *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1532-1541 (2003).

Dejonghe, W., Goris, J., Dierickx, A., De Dobbeller, V., Crul, K., De Vos, P., Verstraete, W., Top, E.M. "Diversity of 3-chloroaniline and 3,4-dichloroaniline degrading bacteria isolated from three different soils and involvement of their plasmids in chloroaniline degradation". *FEMS Microbiology Ecology*, 42, 315-325 (2002).

Del amor, F.M., Serrano-Martinez, A., Fortea, M.I., Legua, P., Núñez-Delicado, E. "The effect of plant-associative bacteria (*Azospirillum* and *Pantoea*) on the fruit quality of sweet pepper under limited nitrogen supply". *Scientia Horticulturae*, 117, 191-196 (2008).

Directiva 1991/414/CE del Consejo de las Comunidades Europeas, de 15 de Julio de 1999, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios (*Diario Oficial* n° L 230 de 19/08/1991 p. 0001 – 0032).

Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de Octubre de 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (*Diario Oficial* L 327 de 22.12.2000).

Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de Diciembre de 2006 relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro (*Diario Oficial* L-2006-82677 p. 19-31).

Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de Octubre de 2009 por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas (*Diario Oficial L-2009-82204 p. 71-86*).

Doan, T.T., Bouvierc, C., Bettarel, Y., Bouvierc, T., Henry-des-Tureauxb, T., Janeau, J.L., Lamballe, P., Nguyenf, V., Jouquet, P. "Influence of buffalo manure, compost, vermicompost and biochar amendments on bacterial and viral communities in soil and adjacent aquatic systems". *Applied Soil ecology*, 73, 78-86 (2014).

Doick, K.J., Dew, N.M., Semple, K.T. "Linking catabolism to cyclodextrin extractability: Determination of the microbial availability of PAHs in soil". *Environmental Science and Technology*, 39 (22), 8858-8864 (2005).

Domanskii, V.P., Domanskaya, I.N., Fradkin, L.I. "The effect of Diuron and 5-aminolevulinic acid on the maintenance of stable chlorophyll content in greening barley leaves". *Russian Journal of Plant Physiology*, 50 (5), 688-693 (2003).

Echigo A., Hino M., Fukushima T., Mizuki T., Kameoka M., Usami R. "Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm)". *Saline Systems*, 1, 8-20 (2005).

Ehlers, G.A.C., Loibner, A.P. "Linking organic pollutant (bio)availability with geosorbent properties and biomimetic methodology: A review of geosorbent characterization and (bio)availability prediction". *Environmental Pollution*, 141, 494-512 (2006).

El Fantroussi, S., Agathos, S.N. "Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?" (Review). *Current Opinion in Microbiology*, 8 (3), 268-275 (2005).

El Imache, A., Dousset, S., Satrallah, A., Dahchour, A. "Effects of sewage sludge amendments on pesticide sorption and leaching through undisturbed Mediterranean soils". *Journal of Environmental Science & Health, Part B*, 47, 161-167 (2012).

El-Bestawy, E., Albrechtsen, H.-J. "Effect of nutrient amendments and sterilization on mineralization and/or biodegradation of ¹⁴C-labeled MCPP by soil bacteria under aerobic conditions". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59 (3), 193-201 (2007).

El-Deeb, B.A., Ali, A.M., Ali, K.A. "Some evidences for the involvement of plasmid in diuron herbicide degradation". *Acta Microbiologica e Immunologica Hungarica*, 47 (1), 63-71 (2000).

Ellegaard-Jensen, L., Knudsen, B.E., Johansen, A., Albers, C.N., Aamand, J., Rosendahl. "Fungal-bacterial consortia increase diuron degradation in water-unsaturated systems". *Science of the Total Environment*, 466-467, 699-705 (2014).

Ellegaard-Jensen, L., Aamand, J., Kragelund, B.B., Johansen, A.H., Rosendahl, S., "Strains of the soil fungus *Mortierella* show different degradation potentials for the phenylurea herbicide diuron". *Biodegradation*, 24 (6), 765-774 (2013).

Ellis, P.A. y Camper, N.D. "Aerobic degradation of diuron by aquatic microorganisms". *Journal of Environmental Science and Health*, B17, 277-289 (1982).

Esteve-Núñez, A., Caballero, A., Ramos, J.L. "Biological degradation of 2,4,6-Trinitrololuene". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65 (3), 335-352 (2001).

Fahy, A., Lethbridge, G., Earle, R., Ball, A.S., Timmis, K.N., McGenity, T.J. "Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater". *Environmental Microbiology*, 7 (8), 1192-1199 (2005).

Fenlon, K.A., Andreou, K., Jones, K.C., Semple, K.T. "The extractability and mineralization of cypermethrin aged in four UK soils". *Chemosphere*, 82, 187-192 (2011).

Fenyvesi, E., Gruiz, K., Verstichel, S., De Wilde, B., Leitgib, L., Csabai, K., Szanislo, N. "Biodegradation of cyclodextrins in soil". *Chemosphere*, 60, 1001-1008 (2005).

Fenyvesi, E., Szeman, J., Szejtli, J., 2Extraction of PAHs and pesticide from contaminated soils with aqueous CD solutions". *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 25, 229-232 (1996).

Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E., Griffith, S.M., Wigington, P.J. "Diuron Occurrence and Distribution in Soil and Surface and Ground Water Associated with Grass Seed Production". *Journal of Environmental Quality*, 32, 171-179 (2003).

FOCUS (2006) "Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration" Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 version 2.0, 434 pp.

Foght, J.M., Semple, K., Gauthier, C., Westlake, D.W.S., Blenkinsopp, S., Sergy, G., Wang, Z., Fingas, M. "Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 322-330 (1998).

Friendrich, M., Grosser, R.J., Kern, E.A., Inskeep, W.P., Ward, D.M. "Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichment and isolation suggests selection based on bioavailability". *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2703-270 (2000).

Frische, T., Höper, H. "Soil microbiological parameters and luminescent bacteria assays as indicators for in situ bioremediation of TNT-contaminated soils". *Chemosphere*, 3 (50), 415-427 (2003).

Fuoco, R., Colombini, M.P. "Electrochemical and spectral evidence of the inclusión of the herbicide difenzoquat by cyclodextrins in aqueous solutions". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 368, 149-154 (1994).

Gao, H., Ma, J., Xu, Li., Jia, L. "Hydroxypropyl- β -cyclodextrin extractability and bioavailability of phenanthrene in humin and humic acid fractions from different soils and sediments". *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 8620-8630 (2014).

Garcia Torres L., Fernandez-Quintanilla C. "Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas". M. A. P.A. *Publicaciones del servicio de Extensión Agraria*, Madrid, 348 (1991).

- Garon, D., Sage, L., Wouessidjewe, D., Seigle-Murandi, F. "Enhanced degradation of fluorene in soil slurry by *Absidia cylindrospora* and maltosyl-cyclodextrin". *Chemosphere*, 56, 159 – 166 (2004).
- Gee, G., Bauder, J.W. "Particle-size analysis hydrometer a simplified method for routine textural analysis and a sensitive test of measurement parameters". *Soil Science Society of America Journal*, 43, 1004-1007 (1986).
- GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.org/blast/>).
- Gevao, B., Jones, K.C., Semple, K.T., Craven, A., Burauel, P. "Nonextractable pesticide residues in soil" (Review). *Environmental Science and Technology*, 37, 7, 138A-144A (2003).
- Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K.T., Pearce, T.G., Jones, K.C. "Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms". *Environmental Science and Technology*, 35, 3, 501-507 (2001).
- Gevao, B., Semple, K.T., Jones, K.C. "Bound pesticide residues in soils: a review". *Environmental Pollution*, 108, 3-14 (2000).
- Ghafoor, A., Jarvis, N.J., Stenstrom, J. "Modelling pesticide sorption in the surface and subsurface soils of an agricultural catchment". *Pest Management Science*, 69, 919-929 (2012).
- Ghazali, F.M., Zaliha, R.N., Rahman, A., Salleh, A.B., Basri, M. "Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 61-61 (2004).
- Ghosh, W., Alam, M., Roy, C., Pyne, P., George, A. "Genome implosion elicits host-confinement in *Alcaligenaceae*: evidence from the comparative genomics of *Tetrathibacter kashmirensis*, a pathogen in the making". *PLoS ONE*, 8 (5), e64856 (2013).
- Ghosh, W., Bagchi, A., Mandal, S., Dam, B., Roy, P. "Tetrathibacter kashmirensis gen. nov., sp. Nov., a novel mesophilic, neutrophilic, tetrathionate-oxidizing, facultatively chemolithotrophic betaproteobacterium isolated from soil from a temperate orchard in Jammu and Kashmir, India". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1779-1787. (2005).
- Giaccomazzi, S., Cochet, N. "Environmental impact of diuron transformation: a review". *Chemosphere*, 56 (11), 1021-1032 (2004).
- Godskesen, B., Holm, P.E., Jacobsen, O.S. "Aging of triazine amine in soils demonstrated through sorption, desorption, and bioavailability measurements". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 510-516 (2005).
- Goldstein, R.M., Mallory, L.M., Alexander, M. "Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation". *Applied and Environmental Microbiology*, 50, 977-983 (1985).
- Gomez de Barreda y Gamón, M., Lorenzo, E., Sáez, A. "Residual herbicide movement in soil columns". *Science of the Total Environment*, 132, 155-165 (1993).
- Gomez-Eyles, J.L., Collins, C.D., Hodson, M.E. "Relative proportions of polycyclic aromatic hydrocarbons differ between accumulation bioassays and chemical methods to predict bioavailability". *Environmental Pollution*, 158, 1, 278-284 (2010).

Gould, S., Scott, R.C. "2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review". *Food and Chemical Toxicology*, 43, 10, 1451-1459 (2005).

Grant, R.J., Daniell, T.J., Betts, W.B. "Isolation and identification of synthetic pyrethroid-degrading bacteria". *Journal of Applied Microbiology*, 92, 534-540 (2002).

Grifoll, M., Selifonov, S.A., Gatlin, C.V., Chapman, P.J. "Actions of a versatile fluorine-degrading bacterial isolated on polycyclic aromatic compounds". *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3711-3723 (1995).

Grosser, R.J., Friendrich, M., Ward, D.M., Inskeep, W.P. "Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichment conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolated ". *Applied and environmental Microbiology*, 66, 2695-2702 (2000).

Gruiz, K. "Biological tools for the soil ecotoxicity evaluation". *Innovative Approaches to the Bioremediation of Contaminated Sites-European Summer School. Soil Remediation Series No 6* (ed.Fava, F. and Canepa, P.) 45-70. INCA, Venice (2005).

Gruiz, K. "Interactive ecotoxicity tests for contaminated soil". In: *ConSoil 2003, Proceedings*, CD of the 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, Forschungszentrum Karlsruhe, Wissenschaftliche Berichte, FZKA 6943 (eds Annokée, G.J.; Arendt, F. and Uhlmann, O.), 267-275. Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, Germany (2003).

Gruiz, K., Feigl, V., Hajdu, Cs., Tolner, M. "Environmental toxicity testing of contaminated soil base don microcalorimetry". *Environmental Toxicology*, 25 (5), 479-486 (2010).

Gruiz, K., Molnár, M., Fenivesy, É. "Evaluation and verification of soil remediation". *Environmental Microbiology Research Trends* (ed. Kurladze, G.V.) 1-57. Nova Science Publishers, New York (2008).

Guitán, F., Carballas, T. "Técnicas de análisis de suelos". ED. Pcrosacro, Santiago de Compostela, (1976).

Gutiérrez H., Arregui M.C. "Comportamiento de los herbicidas en suelos, agua y plantas". *Revista FAVE*, 14, 73-89 (2000).

Han, Y.Y., Zhang, W.Z., Zhang, B.L., Zhang, S.S., Wang, W., Ming, F. "One novel mitochondrial citrate synthase fom *Oryza sativa* L. can enhance aluminum tolerance in transgenic tobacco". *Molecular Biotechnology*, 42, 299-305 (2009).

Haritash, A.K., Kaushik, C.P. "Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review". *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1-15 (2009).

Harmsen, J., Rulkens, W.H., Sims, R.C., Rijtema, P.E., Zweers, A.J. "Theory and application of landfarming to remediate PAHs and mineral oil contaminated soils and sediments". *Journal Environmental Quality*, 36, 1112-1122 (2007).

Hazai, E., Hazai, I., Demko, L., Kovacs, S., Malik, D., Akli, P., Hari, P., Szeman, J., Fenyvesi, E., Benes, E., Szenté, L., Bikadi, Z. "Cyclodextrin knowledgebase a web-based service managing CD-ligand complexation data". *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24, 713-716 (2010).

- Herrero-Hernández, E.; Andrades, M.S.; Rodríguez-Cruz, M.S.; Sánchez-Martín, M.J. "Effect of spent mushroom substrate applied to vineyard soil on the behaviour of copper-based fungicide residues". *Journal of Environmental Management*, 92, 1849-1857 (2011).
- Hickman, Z.A., Swindell, A.L., Allan, I.J., Rhodes, A.H., Semple, K.T., Hare, R., Reid, B.J. "Assessing biodegradation potential of PAHs in complex multi-contaminant matrices. *Environmental Pollution*, 156, 1041-1045 (2008).
- Higuchi, T., Connors, K.A. "Phase-solubility techniques". *Advance in Analytical Chemistry and Instrumentation*, 4, 117 – 212 (1965).
- Hilber, I., Bucheli, T.D., Wyss, G.S., Schulin, R. "Assessing the phytoavailability of dieldrin residues in charcoal-amended soil using tenax extraction". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 4293-4298 (2009).
- Hofman, J., Rhodes, A., Semple, K.T. "Fate and behaviour of phenanthrene in the natural and artificial soils". *Environmental Pollution*, 152 (2), 468-475 (2008).
- Hudcova, T., Halecky, M., kozliak, E., Stiborova, M., Paca, J. "Aerobic degradation of 2,4-dinitrotoluene by individual bacterial strains and defined mixed population in submerged cultures". *Journal of Hazardous Materials*, 192, 605-613 (2011).
- Hyperchem 8.0.8. for Windows™. Hypercube Inc. website. (<http://www.hyper.com>) (2009).
- Inoue, M.H., Oliveira Jr, R.S., Regitano, J.B., Tormena, C.A., Constantin, J., Tornisiello, V.L. "Sorption-desorption of atrazine and diuron in soils from southern Brazil". *Journal of Environmental Science and Health Parte B*, 41, 605-621 (2006).
- Inoue, M.H., Olivera, R.S.Jr., Constantin, J., Alonso, D.G., Tormena, C.A. "Bioacailability of diuron, amazapic and isoxaflutole in soils of contrasting textures". *Journal of Environmental Science and Health Parte B*, 44, 757-763 (2009).
- Ishiwata, S., kamiya, M. "Cyclodextrin inclusion: catalytic effects on the degradation of organophosphorus pesticides in neutral aqueous solutions". *Chemosphere*, 39, 1595-1600 (1999).
- Ishiwata, S., kamiya, M. "Structural study on onclusion complexes of cyclodextrins with organophosphorus pesticides by use of rotational strength analysis method". *Chemosphere*, 41, 701-704 (2000).
- ISO 17402:2011. Calidad del suelo. Requisitos y directrices para la selección y aplicación de métodos de evaluación de la biodisponibilidad de contaminantes en suelo y en materiales del suelo (ISO17402:2008) (Ratificada por AENOR en agosto de 2011).
- Jacinthe, P.A., Pichtel, J.R. "Interaction of nitrapyrin and dicyandiamide with soil humic compounds". *Soil Science Society of America Journal*, 56 (2), 465-470 (1992).
- Jackson, M.L. "Análisis químico de los suelos". 4ª Edición. ED. Omega. Barcelona (1982).
- Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O. "Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil". *Bioresource Technology*, 99, 2637-2643 (2008).

Jahn, M.K., Haderlein, S.B., Meckenstock, R.U. "Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene in sediment-free iron-reducing enrichment cultures". *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6), 3355-3358 (2005).

Jhala, A.J. y Singh, M. "Leaching of indaziflam compared with residual herbicides commonly used in Florida citrus". *Weed Technology*, 26, 602-607 (2012).

Job, P. "Recherches sur la formation de complexes minéraux en solution et sur leur stabilité". *Annali di Chimica*, 10, 113 – 203 (1928).

Johnsen, A.R., Winding, A., Karlson, U., Roslev, P. "Linking of micro-organisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of ¹³C-labelled cell-lipids". *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 6106-6113 (2002).

Johnston, C.D., Fisher, S., Rayner, J.L. "Removal of petroleum hydrocarbons from the vadose zone during multi-phase extraction at a contaminated industrial site". *IAHS-AISH Publication*, number 275 (2002).

Joner, E.J., Corgié, S., Amellal, N., Leyval, C. "Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 34,859-864 (2002).

Jones, M.N., Bryan N.D. "Colloidal properties of humic substances ". *Advances in Colloid and Interface Science*, 78, 1-48 (1999).

Jonhson, K., Ghosh, S. "Feasibility of anaerobic biodegradation of PAHs in dredged river sediments". *Water Science and Technology*, 38, 41-48 (1998).

Juhasz, A.L., Stanley, G.A., Britz, M.L. ""Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003". *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiolgy*, 30, 396-401(2000).

Jullian, C., Moyano L., Yanez C., Olea-Azar C. "Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrins: An antioxidant study". *Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 67, 230-234 (2007).

Kamiya, M., Nakamura, K. "Cyclodextrin inclusion effects on photodegradation rates of organophosphorus". *Environmental International*, 21, 299-304 (1995).

Kao, C.M., Chai, C.T., Liu, J.K., Yeh, T.Y., Chen, K.F., Chen, S.C. "Evaluation of natural and enhanced PCP biodegradation at a former pesticide manufacturing plant". *Water Research*, 38 (3), 663-672 (2004).

Kao, C.M., Prosser, J. "Evaluation of natural attenuation rate at a gasoline spill site". *Journal of Hazardous Materials*, 82 (3), 375-289 (2001).

Kasozi, G. N., Nkedi-Kizza, P., Agyin-Birikorang, S., Zimmerman, A. R. "Characterization of adsorption and degradation of diuron in carbonatic and noncarbocatic soils". *Journal Agricultural and Food Chemistry* 58, 1055-1061 (2010).

- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., Mahro, B. "Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic hydrocarbons (PAH)". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 267-273 (1994).
- Kazunga, C., Aitken, M.D. "Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria". *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1917-1922 (2000).
- Kazunga, C., Aitken, M.D., Gold, A., Sangaia, R. "Fluoranthene-2,3-and-1,5-diones are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene". *Environmental Science & Technology*, 35, 917-922 (2001).
- Kelsey, J.W., Alexander, M. "declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (3), 582-858 (1997).
- Kelsey, J.W., Kottler, B.D., Alexander, M. "Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals". *Environmental Science & Technology*, 31, 214-217 (1997).
- Khomenkov, V.G., Shevelev, A.B., Zhukov, V.G., Zagustina, N.A., Bezborodov, A.M., Popov, V.O. Organization of metabolic pathways and molecular-genetic mechanisms of xenobiotic degradation in microorganisms: A review". *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44 (2), 117-135 (2008).
- Khurana, J.L., Jackson, C.J., Scott, C., Pandey, G., Horne, I., Russell, R.J., Herlt, A., Easton, C.J., Oakeshott, J.G. "Characterization of the phenylurea hydrolases A and B: founding members of a novel amidohydrolase subgroup". *Biochemical Journal*, 418, 485-492 (2009).
- Kim, B.Y., Weon, H.Y., Yoo, S.H., Lee, S.Y., Kwon, S.W., Go S.J. "Variovorax soli sp. Nov., isolated from greenhouse soil". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 2899-2901 (2006).
- Kirtland, B. C., Aelion, C.M., Stone, P.A. "Monitoring anaerobic natural attenuation of petroleum using a novel in situ respiration method in low-permeability sediment". *Bioremediation Journal*, 4 (3), 187-201 (2000).
- Ko, S.O., Yoo, H.C. "Enhanced desorption of Phenanthrene from soils using hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Experimental results and model predictions". *Journal of Environmental Science and Health*, 6, 829-841 (2003).
- Kookana, R.S., Di, H.J., Aylmore, A.G. "A field study of leaching and degradation of nine pesticide in a sandy soil". *Australian Journal of Soil Research*, 33, 1019-1030 (1995).
- Krauss, I.J., Wilcke, W. "Predicting soil-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls by desorption with methanol-water mixtures at different temperatures". *Environmental Science and Technology*, 35, 2319 – 2335 (2001).
- Krogh, K.A., Halling-Sorensen, B., Mogensen, B.B., Vejrup, K.V. "Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticide: a review". *Chemosphere*, 50, 871-901 (2001).

Kudsk, P., Streibig, J.C. "Herbicides, a two edged sword" (Review). *Weed Research*, 43 (2), 90-102 (2003).

Labrada R., Caseley J.C., Parker C. "Manejo de Malezas para Países en desarrollo (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal-120)". Departamento de Agricultura. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*, Roma (1996).

Langeron, J., Sayen, S., Couderchet, M., Guillon, E. "Leaching potential of phenylurea herbicides in a calcareous soil: comparison of column elution and batch studies". *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 4906-4913 (2014).

Lapworth, D.J., Gooddy, D.C. "Source and persistence of pesticides in a semi-confined chalk aquifer of southeast England". *Environmental Pollution*, 144 (3), 1031-1044 (2006).

LeFevre, G. H., Hozalski, R. M., Novak, P. J. "Root exudate enhanced contaminant desorption: an abiotic contribution to the rhizosphere effect". *Environmental Science & Technology*, 47, 11545-11553 (2013).

Leitgib, L., Gruiz, K., Molnár, M., Fenyvesi, É. "Biorremediation of transformer oil contaminated soil" ConSoil, Proceedings, CD of the 8th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil, Forschungszentrum Karlsruhe, Wissenschaftliche Berichte, FZKA 6943 (eds Annokkée, G.J.; Arendt, F. and Uhlmann, O.), 2762-2771 Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, Germany (2003).

Lendvay, J.M., Löffler, F.E., Dollhopf, M., Aiello, M.R., Daniels, G., Fathepure, B.Z., Gebhard, M., Heine, R., Helton, R., Shi, J., Krajmalnik-Brown, R., Major Jr., C.L., Barcelona, M.J., Petrovskis, E., Hickey, R., Tiedje, J.M., Adriaens, P. "Bioreactive barriers: A comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation". *Environmental Science and Technology*, 37 (7), 1422-1431 (2003).

Ley 10/1998, de 21 de Abril de Residuos, BOE, núm. 96, pp. 13372-13384 (BOE-A-1998-9478).

Ley 22/2011, de 28 de Julio, de Residuos y suelos contaminado, BOE, núm. 181 (BOE-A-2011-13046).

Lezcano, M., Al-Soufi, W., Novo, M., Rodríguez-Núñez, E., Vázquez Tato, J. "Complexation of several benzimidazole-type fungicides with α - and β -cyclodextrins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (1), 108-112 (2002).

Li, L., Cunningham, C.J., Pas, V., Philp, J.C., Barry, D.A., Anderson, P. "Field trial of a new aeration system for enhancing biodegradation in a biopile". *Waste Management*, 24, (2), 127-137 (2004).

Li, X.J., Lin, X., Li, P.J., Liu, W., Wang, L., Ma, F., Chukwaka, K.S. "Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation". *Journal of Hazardous Materials*, 172, 601-605 (2009).

Lin, Z., Puls, R.W. "Potential indicators for the assessment of arsenic natural attenuation in the subsurface". *Advances in Environmental Research*, 7 (4), 825-834 (2003).

- Ling, W., Ren, L., Gao, Y., Zhu, X., Sun, B. "Impact of low-molecular-weight organic acids on the availability of phenanthrene and pyrene in soil". *Soil Biology & Biochemistry*, 41, 2187-2195 (2009).
- Liu, Z., He, Y., Xu, J., Huang, P., Jilani, G. "The ratio of clay content to total organic carbon content is a useful parameter to predict adsorption of the herbicide butachlor in soils". *Environmental Pollution*, 152, 163-171 (2008).
- Liu, Z., He, Y., Xu, J., Zeng, F. "How do amorphous sesquioxides affect and contribute to butachlor retention in soils?". *Journal of Soils and Sediments*, 13, 617-628 (2013).
- Lladó, S., Gracia, E., Solanas, A.M., Viñas, M. "Fungal and bacterial microbial community assessment during bioremediation assays in an aged creosote-polluted soil". *Soil Biology and Biochemistry*, 67, 114-123 (2013).
- Lo, C.C. "Effect of pesticides on soil microbial community". *Journal of Environmental Science and Health*, part B, 45, 348-359 (2010).
- López, R., Cabeza, I.O., Giráldez, I., Díaz, M. J. "Biofiltration of composting gases using different municipal solid waste-pruning residue composts: Monitoring by using an electronic nose". *Bioresource Technology*, 102 (17), 7984-7993 (2011).
- López-Piñeiro, A., Peña, D., Albarrán, A., Becerra, D., Sánchez-Llerena, J. "Sorption, leaching and persistence of metribuzin in Mediterranean soils amended with olive mill waste of different degrees of organic matter maturity". *Journal of Environmental Management.*, 122, 76-84 (2013).
- Louchart X., Voltz M. "Aging effects on the availability of herbicides to runoff transfer". *Environmental Science & Technology*, 41, 1137-1144 (2007).
- Lovley, D.R. "Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. Nature Reviews". *Microbiology*, 1 (1), 35-44 (2003).
- Lu, Y., Pignatello, J.J. "Demonstration of the "Conditioning effect" in soil organic matter in support of a pore deformation mechanism for sorption hysteresis". *Environmental Pollution*, 36, 4553-4561 (2002).
- Luo, L., Zhang, S., Shan, X-Q., Zhu, Y-G. "Oxalate and root exudates enhance the desorption of p,p'-DDT from soil". *Chemosphere*, 63, 1273-1279 (2006).
- Luo, Q.S., Wang, H., Zhang, X.H., Fan, X., Qian, Y. "In situ bioelectrokinetic remediation of phenol-contaminated soil by use of an electrode matrix and a rotational operation mode". *Chemosphere*, 64 (3), 415-422 (2006).
- Luo, Q.S., Wang, H., Zhang, X.H., Qian, Y. "Movement and transformation of nitrate in soil by non-uniform electrokinetics". *Environmental Science*, 25, 107-113 (2004).
- Mahmood, S., Paton, G.I., Prosser, J.I. "Cultivation-independent in situ molecular analysis of bacteria involved in degradation of pentachlorophenol in soils". *Environmental Microbiology*, 7 (9), 1349-1360 (2005).

Malato, S., Cáceres, J., Fernández-Alba, A.R., Piedra, L., Hernando, M.D., Agüera, A., Vial, I. "Photocatalytic treatment of diuron by solar photocatalysis: evaluation of main intermediates and toxicity". *Environmental Science and Technology*, 37, 2516-2524 (2003).

Mamy, L., Barriuso, E. "Desorption and time-dependent sorption of herbicides in soils". *European Journal of Soil Science*, 58, 174-187 (2007).

Mao, D-P., Zhou, Q., Chen, C-Y., Quan, Z-H. " Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets". *BMC Microbiology*, 12, 66 (2012).

Maqueda, C., Morillo, E., Martin, F., Undabeytia, T. "Interaction of pesticides with the soluble fraction of natural and artificial humic substances". *Journal of Environmental Science & Health, Part B*, 6 (1993).

Maqueda, C., Morillo, E., Undabeytia, T. "Cosorption of glyphosate and copper (II) on goethite". *Soil Science*, 21, 452-463 (2002).

Maqueda, C., Morillo, E., Undabeytia, T., Martín, F. "Sorption of glyphosate and Cu(II) on a natural fulvic acid complex: Mutual influence". *Chemosphere*, 37 (6), 1063-1072 (1998).

Maqueda, C., Partal, P., Villaverde, J., Perez-Rodriguez, J.L. "Characterization of sepiolite-gel-based formulations for controlled release of pesticides". *Applied Clay Science*, 46 (3), 289-295 (2009).

Maqueda, C., Rodriguez, J.L.F., Justo, A. "Problems in the dissolution of silicates by acid mixtures". *The Analyst*, 3 (9)1107-1108 (1986).

Maqueda, C., Villaverde, J., Sopeña, F., Undabeytia, T., Morillo, E. "Novel system for reducing leaching of the herbicide metribuzin using clay-gel-based formulations". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (24), 11941-11946 (2008).

Martin, B.C., George, S.J., Price, C.A., Ryan, M.H., Tibbett, M. "The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions". *Science of the Total Environmental*, 472, 642-653 (2014).

Martínez-Blanco, J., Lazcano, C., Christensen, T.H., Muñoz, P., Rieradevall, J., Moller, J., Antón, A., Boldrin A. "Compost benefits for agricultura evaluated by life cycle assessment. A review". *Agronomy for Sustainable Development*, 33, 4 721-732 (2013).

Mathews, C.K., van Holde, K.E., Ahern, K.G. Ed. "Bioquímica". Tercera Edición. Pearson Educación, S.A. Núñez de Balboa, 120, Madrid. IBSN: 0-8053-3066-6 (2002).

McCray, J.E., Brusseau, M.L. "Cyclodextrin enhanced in situ flushing of multiple component immiscible organic liquid contamination at the field scale: mass removal effectiveness". *Environmental Science and Technology*, 32, (9), 1285-1293 (1998).

McKeague, J.A., Brydon, J.E., Miles, N.M. "Differentiation of forms of extractable iron and aluminium in soil". *Soil Science Society of America, Proceedings*, 35, 33-38 (1971).

- McNally, D.L., Mihelcic, J.R., Lueking, D.R. "Biodegradation of three-and four-ring polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and denitrifying conditions". *Environmental Science and Technology*, 32, 2633-2639 (1998).
- Menn, F.M., Easter, J.P., Sayler, G.S. "Bacterial activity enhancement and soil decontamination". In H.J. Rehm, G. Reed A. Puhler and P. Stadler, editor; *Biotechnology. Environmental Process II. Soil Decontamination*. Wiley-VCH. Weinheim. 425-439 (2000).
- Mihopoulos, P.G., Cuidan, M.T., Sayles, G.D. "Complete remediation of PCE contaminated unsaturated soil by sequential anaerobic-aerobic bioventing". *Water Science and Technology*, 43 (5), 365-372 (2001).
- Mihopoulos, P.G., Suidan, M.T., Sayles, G.D., Kaskassian, S. "Numerical modeling of oxygen exclusion experiments of anaerobic bioventing". *Journal of Contaminant Hydrology*, 58 (3-4), 209-220 (2002).
- Mikesková, H., Novotný, C., Svobodová, K. "Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 861-870, (2012).
- Mohn, W.W., Radziminski, C.Z., Fortin, M.C., Reimer, K.J., "On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (1-2), 242-247 (2001).
- Molnár, M., Fenivesy, É., Gruiz, K., Leitgib, L., Balogh, G., Murányi, A., Szejtli, J. "Effect of RAMEB on bioremediation of different soils contaminated with hydrocarbons". *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44, 447-452 (2003).
- Molnár, M., Fenyvesi, E., Gruiz, K., Illés, G., Nagy, Z., Hajdu, C., Kánnai, P. "Laboratory testing of biodegradation in soil: comparison of chemical and biological methods". *Land Contamination & Reclamation*, 17 (3-4) (2009).
- Molnár, M., Gruiz, K., Halász, M. "Integrated methodology including toxicity test-battery to evaluate the bioremediation potential of creosote-contaminated soils in lab-scale experiments". *Periodica Polytechnica*, 51 (1), 23-32 (2007).
- Molnár, M., Leitgib, L., Gruiz, K., Fenyvesi, E., Szaniszló, N., Szejtli, J., Fava, F. "Enhance biodegradation of transformer oil in soil with cyclodextrin-from the laboratory to the field". *Biodegradation*, 16, 159-168 (2005).
- Mordaunt, C.J., Geva, B., Jones, K.C. "Formation of non-extractable pesticide residues: observations on compound differences, measurement and regulatory issues". *Environmental Pollution*, 133 (1), 25-34 (2005).
- Morillo, E. "Application of cyclodextrins in agrochemistry. In: Cyclodextrins and their complexes". Dodziuk (ed.), Wiley-VCH, 459-466 (2006).
- Morillo, E., Maqueda, C. "Simultaneous adsorption of chlordimeform and zinc on montmorillonite". *Science of the Total Environment*, 123-124, 133-143 (1992).

Morillo, E., Maqueda, C., Reinoso, R., Undabeytia, T. "Effect of two organic amendments on norflurazon retention and release by soils of different characteristics". *Environmental Science and Technology*, 36 (20), 4319-4325 (2002).

Morillo, E., Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M. "Leaching of 2,4-D from a soil in the presence of β -cyclodextrin: Laboratory columns experiments". *Chemosphere*, 44 (5), 1065-1069 (2001).

Morillo, E., Sánchez-Trujillo, M.A., Moyano, J.M., Villaverde, J., Gómez-Pantoja, E., Pérez-Martínez, J.I. "Enhanced solubilisation of six PAHs by three synthetic cyclodextrins for remediation applications: molecular modeling of the inclusion complexes". *PLOS ONE*, 7 (9): e44137 (2012).

Morillo, E., Undabeytia, T., Cabrera, A., Villaverde, J., Maqueda, C. "Effect of soil type on adsorption-desorption, mobility, and activity of the herbicide norflurazon". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 884-890 (2004).

Morillo, E., Undabeytia, T., Maqueda, C. "Adsorption of glyphosate on the clay mineral montmorillonite: Effect of Cu(II) in solution and adsorbed on the mineral". *Environmental Science and Technology*, 31 (12), 3588-3592 (1997b).

Morillo, E., Undabeytia, T., Maqueda, C., Ramos, A. "Glyphosate adsorption on soils of different characteristics. Influence of copper addition". *Chemosphere*, 40, 103-107 (2000).

Mrozik, A., Piotrowska-Seget. "Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds". *Microbiological Research*, 165, 363-375 (2010).

Naidu, R., Semple, K.T., Megharaj, M., Juhasz, A.L., Bolan, N.S., Gupta, S.K., Clothier, B.E., Schulin, R. "Chapter 3, Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment" (Review). *Developments in Soil Science*, 32 (C), 39-51 (2008).

Nam, k., Alexander, M. "Role of loosely bound humic substances and humic in the bioavailability of phenanthrene aged in soil". *Environmental Pollution*, 118, 427 – 433 (1998a).

Nam, K., Kim, J.Y. "Role of loosely bound humic substances and humic in the bioavailability of phenanthrene aged in soil". *Environmental Pollution*, 118, 427-433 (2002). Meeting Abstract: PII S0269-7491(01)00296-2.

Navarro, S., Hernández-Bastida, J., Cazaña, G., Pérez-Lucas, G., Fenoll, J. "Assessment of the leaching potential of 12 substituted phenylurea herbicides in two agricultural soils under laboratory conditions". *Journal Agricultural and Food Chemistry* 60, 5279-5286 (2012).

Ngigi, A., Getenga, Z., Boga, H., Ndalut, P. "Biodegradation of phenylurea herbicide diuron by microorganisms from long-term-treated sugarcane-cultivated soils in Kenya". *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93 (8), 1623-1635 (2011).

Nieman, J.K., Sims, R.C., Sorensen, D.L., Malean, J.E. "Humic acid toxicity in biologically treated soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons and pentachlorophenol". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 49 (3), 283-289 (2005).

Nikolova, N., Nenov, V. "BTEX degradation by fungi". *Water Science Technology*, 51 (11), 87-93 (2005).

- Nkambule, T.I., Krause, R.W., Mamba, B.B., Haarhoff, J. "Removal of natural organic matter from water using ion-exchange resins and cyclodextrin polyurethanes". *Physics and Chemistry of the Earth*, 34, 13-16, 812-818 (2009).
- Nobre, R.C.M., Nobre, M.M.M. "Natural attenuation of chlorinated organics in a shallow sand aquifer". *Journal of Hazardous Materials*, 110 (1-3), 129-137 (2004).
- Northcott, G.L., Jones, K.C. "Partitioning, Extractability, and formation of nonextractable PAH residues in soil. Compound differences in aging and sequestration". *Environmental Science and Technology*, 35, 1103-1110 (2001).
- Nyer, E.K., Payne, F., Suthersan, S. "Environment vs. bacteria or let's play 'name that bacteria'". *Ground Water Monit Remediat*, 23, 36-45 (2002).
- Oliver, D.D., Clyde, C.D., Norman, C.G. "Evaluation of cyclodextrin complexes of pesticides for use in minimization of groundwater contamination". *Pesticide Formulation and Applications Systems: 10th Volume*, ASTM STP 1078, L.E. (1993).
- Oliveros-Bastidas, A., Macías, F. A., Carrera, C., Marín, D., Molinillo, J. M. G. "Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas". *Química Nova*, 32 (1), 198-213 (2009).
- Ortega-Calvo, J.J., Tejada-Agredano, M.C., Jimenez-Sanchez, C., Congiu, E., Sungthong, R., Niqui-Arroyo, J.L., Cantos, M. "Is it possible to increase bioavailability but not environmental risk of PAHs in bioremediation?". *Journal of Hazardous Materials*, 216, 733-745 (2013).
- Otani, T., Seike, N. "Rootstock control of fruit dieldrin concentration in grafted cucumber (*Cucumis sativus*)". *Journal of Pesticide Science*, 32, 235-242 (2007).
- Papadopoulos, A., Paton, G.I., Reid, B.J. "Prediction of PAH biodegradation in field contaminated soils using a cyclodextrin extraction technique". *Journal of Environmental Monitoring*, 9 (6), 516-522 (2007).
- Paquete estadístico IBM SPSS V. 21.
- Patsias, J., Papadakis, E.N., Papadopoulou-Mourkidou, E. "Analysis of phenoxyalkanoic acid herbicides and their phenolic conversion products in soil by microwave assisted solvent extraction and subsequent analysis of extracts by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, 959 (1-2) 153-161 (2002).
- Pérez-de-Mora, A., Burgos, P., Madejón, E., Cabrera, F., Jaekel, P., & Schloter, M. Microbial community structure and function in a soil contaminated by heavy metals: effects of plant growth and different amendments. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 327-341. Doi: 10.1016/j.soilbio.2005.05.010 (2006).
- Pérez-Maqueda, L.A., Criado, J.M., Real, C., Subrt, J., Bohacek, J. "The use of constant rate thermal analysis (CRTA) for controlling the texture of hematite obtained from the thermal decomposition of goethite". *Journal of Materials Chemistry*, 9 (8), 1839-1845 (1999).
- Pérez-Martínez J.I., Ginés, J.M., Morillo, E., Rodríguez, M.L.G., Moyano, J.R. "2,4-dichlorophenoxyacetic acid/partially methylated-cyclodextrin inclusion complexes". *Environmental Technology*, 21, 209-216 (2000a).

Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M., Morillo, E., Moyano, J.R. "1H- Nuclear magnetic resonance and phase solubility studies of the stoichiometries in 2,4-D: α - and β -cyclodextrins inclusion complexes". *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 37, 171-178 (2000b).

Pérez-Martínez, J.I., Morillo, E., Ginés, J.M. " β -CD effect on 2,4-D soil adsorption". *Chemosphere*, 39, 2047-2056 (1999).

Pesce, S., Beguet, J., Rouard, N., Devers-Lamrani, M., Martin-Laurent, F. "Response of a diuron-degrading community to diuron exposure assessed by real-time quantitative PCR monitoring of phenylurea hydrolase A and B encoding genes". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1661-1668 (2012).

Petrovic, M., Hernando, M.D., Diaz-Cruz, M.S., Barcelo, D. "Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review". *Journal of Chromatography A*, 1067 (1-2), 1-14 (2005).

Pignatello, J.J., Xing, B.S. "Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles". *Environmental Science and Technology*, 30, 1-11(1996).

Pino, M., Penuela, G. "Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 8, 827-831 (2011).

Plaza, G., Ulfing, K., Worsztynowicz, A., Malina, G., Krzeminska, B., Brigmon, R.L. "Respirometry for assesing the biodegradation of petroleum hydrocarbons". *Environmental Technology*, 26 (2), 161-169 (2005).

Polubesova, T., Sherman-Nakache, M., Chefetz, B. "Binding of pyrene to hydrophobic fractions of dissolved organic matter: effect of polyvalent metal complexation". *Environmental Science and Technology*, 41, 5389-5394 (2007).

Potin, O., Veignie, E., Rafia, C. "Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil". *FEMS Microbiology Ecology*, 51 (1), 71-78 (2004).

Prenafeta-Boldu, F.X., Ballerstedt, H., Gerritse, J., Grotenhuis, J.T. "Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1". *Biodegradation*, 15 (1), 59-65 (2004).

Prenafeta-Boldu, F.X., Vervoort, J., Grotenhuis, J.T., Van Groenestijn, J. W. "Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1". *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (6), 2660-2665 (2002).

Puglisi, E., Murk, A.J., Van Den Berg, H.J., Grotenhuis, T. "Extraction and bioanalysis of the ecotoxicologically relevant fraction of contaminants in sediments". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 10, 2122-2128 (2007).

Qureshi A., Mohan M., Kanade G.S., Kapley A., Purohit H.J. "In situ bioremediation of organochlorine-pesticide-contaminated microcosm soil and evaluation by gene probe". *Pest Management Science* 65, 798-804 (2008).

Rahman, K.S.M., Banat, IM., Thahira, J., Thayumanavan, T., Lakshmanaperumalsamy, P. "Biorremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith, and rhamnolipid biosurfactant". *Bioresource Technology*, 81,25-32 (2002a).

Rahman, K.S.M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., Banat, IM. "Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium". *Bioresource Technology* 85, 257-261 (2002b).

Real Decreto 824/2005 (ANEXO V), 8 de Julio sobre productos fertilizantes, BOE, núm. 171. (BOE-A-2005-12378).

Real Decreto 1311/2012 de 4 de Septiembre, por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios, BOE, núm. 223, sec I, p 65127-65171.

Real Decreto 9/2005 de 14 de Enero, por el que se estable la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, BOE, núm. 15, p 1833-1843 (BOE-A-2005-895).

Regitano, J.B., Koskinen, W.C., Sadowsky, M.J. "Influence of soil aging on sorption and bioavailability of simazine". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1373-1379 (2006).

Reichenberg, F., Mayer, P. "Two complementary sides of bioavailability: Accessibility and chemical activity of organic contaminants in sediments and soils". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (5), 1239-1245 (2006).

Reid, B.J., Mcleod, C.J.A., Lee, P.H., Morris A.W.J., Stokes, J.D., Semple, K.T. "A simple ¹⁴C-respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability". *FEMS Microbiology Letters* 196, 141-146 (2001).

Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T. "Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability". *Environmental Science and Technology*, 34, 3174-3179 (2000).

Rhodes, A.H., Dew, N.M., Semple, K.T. "Relationship between cyclodextrin extraction and biodegradation of phenanthrene in soil". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (7), 1488-1495 (2008).

Riding, M.J., Doick, K.J., Martin, F.L., Jones, K.C., Semple, K.T. "Chemical measures of bioavailability/bioaccessibility of PAHs in soil: Fundamentals to application". *Journal of Hazardous Materials*, 261, 687-700 (2013).

Rivero-Huguet, M., Marshall, W.D. "Scaling up a treatment to simultaneously remove persistent organic pollutants and heavy metals from contaminated soils". *Chemosphere*, 83 (5), 668-673 (2011).

Rockne, K.J., Chee-Sanford, J.C., Sandford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T. "Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate reducing conditions". *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1000-1005 (2000).
Romantschuk, M., Sarand, I., Petänen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjälä, K., Haahtela, K. "Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches". *Environmental Pollution*, 107, 179-185 (2000).

Rodríguez-Cruz, M.S., Sánchez-Martin, M.J., Sánchez-Camazano, M. "Surfactant-enhanced desorption of atrazine and linuron residues as affected by aging of herbicides in soil". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50 (1), 128-137 (2006).

Roldán, I., Hermosín, M.C., Cornejo, J. "Interaction of pyridazine herbicide with montmorillonite and lepidocrocite". *II Workshop Pesticides soils*, Alicante (1991).

Romantschuk, M., Sarand, I., Petänen, T., Peltola, R., Jonsson-Vihanne, M., Koivula, T., Yrjälä, K., Haahtela, K. "Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution*, 107, 179-185 (2000).

Romero, E., Fernández-Bayo, J., Castillo Díaz, J.M., Nogales, R. "Enzyme activities and diuron persistence in soil amended with vermicompost derived from spent grape marc and treated with urea". *Applied Soil Ecology*, 44, 198-204 (2010).

Ronchel, M.C., Molina, L., Witte, A., Lutbiz, W., Molina, S., Ramos, J.L., Ramos, C. "Characterization of cell lysis in *Pseudomonas putida* induced upon expresión of heterologous killing genes". *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (12), 4904-4911 (1998).

Ross, A. B., Jones, J.M., Chaiklangmuang, S., Pourkashanian, M., Willians, A., Kubica, K., Andersson, J. T., kerst, M., Danihelka, P., Bartle, K.D. "Measurement and prediction of the emission of pollutants from the combustion of coal and biomass in a fixed bed furnace". *Fuel*, 81 (5), 571-582 (2002).

Saichek, R.E., Reddy, K.R. "Effect of pH control at the anode for the electrokinetic removal of phenanthrene from kaolin soil". *Chemosphere*, 51, 273-287 (2003).

Salvestrini, S. "Diuron herbicide degradation catalyzed by low molecular weight humic acid-like compounds". *Environmental Chemistry Letters*, 11, 359-363 (2013).

Salvestrini, S., Di Cerbo, P., Capasso, S. "Kinetics of the chemical degradation of diuron". *Chemosphere*, 48, (1), 69-73 (2002).

Sánchez, L., Romero, E., Sánchez-Rasero, F.S., Dios, G., Peña, A. "Enhanced soil sorption of methidation using sewage sludge and surfactants". *Pest Management Science*, 59, 857-864 (2003).

Sánchez-Camazano, M., Sánchez-Martín, M.J., Poveda, E., Iglesias-Jiménez, E. "Study of the effect of exogenous organic matter on the mobility of pesticides in soils using soil thin-layer chromatography". *Journal of Chromatography A*, 754, 279-284 (1996).

Sánchez-Camazano, M., Sánchez-Martin, M.J., Rodríguez-Cruz, M.S. "Sodium dodecyl sulphate-enhanced desorption of atrazine: effect of surfactant concentration and of organic matter content of soils". *Chemosphere*, 41, 1301-1305 (2000).

Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez, Andrades, M.S., Sánchez-Camazano, M. "Efficiency of different clay minerals modified with a cationic surfactant in the adsorption of pesticides: Influence of clay type and pesticide hydrophobicity". *Applied Clay Science*, 31 (3-4) 216-228 (2006).

- Sánchez-Martín, M.J., Rodríguez-Cru, M.S., Sánchez-Camazano, M. "Study of the desorption of linuron from soils to water enhanced by the addition of an anionic surfactante to soil-water system." *Water Research*, 37, 3110 – 3117 (2003).
- Sánchez-Trujillo, M.A., Morillo, E., Villaverde, J., Lacorte, S. "Comparative effects of several cyclodextrins on the extraction of PAHs from an aged contaminated soil2. *Environmental Pollution*, 178, 52-58 (2013).
- Scott, R.L. "Somme comments on the Benesi-Hildebrand equation". *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. 75, 787 – 789 (1956).
- Semple, K.T, Reid, B.J., Fermor, T.R. "Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants". *Environmental Pollution*, 112, 269-283(2001).
- Semple, K.T., Dew, N.M., Doick, K.J., Rhodes, A.H. "Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil?". *Environmental Pollution*, 140, 164-172 (2006).
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H. "Defining Bioavailability and Bioaccessibility of Contaminated Soil and Sediment is Complicated". *Environmental Science and Technology*, 38, 228A-231A (2004).
- Semple, K.T., Doick, L.J., Wick, L.Y., Harms, H. "Microbial interactions with organic cantaminants in soil: Definitions, processes and measurement". *Environmental Pollution*, 150, 1, 166-176 (2007).
- Semple, K.T., Morriss, A.W.J., Paton, G.I. "Bioavailability of hydrophobic organic contaminats in soils: fundamental concepts and techniques for analysis". *European Journal of Soil Science*, 54, 809-818 (2003).
- Shahzad-ul-Hussan, S., Cai, M., Bewley, C. A. "Unprecedented glycosidase activity at a lectin carbohydrate-binding site exemplified by the cyanobacterial lectin MVL". *Journal of the American Chemical Society*, 131 (45), 16500-16508 (2009).
- Shan, Y., Zhou, J., Zhao, H.G., Feng, X., Dong, Y., Xia, B. "Amino-acid and mineral composition of *Stellaria media*". *Chemistry of Natural Compounds*, 46, 4, 667-668 (2010).
- Sharer, M., Park, J.H., Voice, T.C. "Aging effects on the sorption-desorption characteristics of anthropogenic organic compounds in soil". *Journal of Environmental Quality*, 32, 1385-1392 (2003).
- Sheng, G., Johnton, C.T., Teppen, B.J., Boyd, S.A. "Potencial contributions of smectite clays and organic matter to pesticide retention in soils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2899-2907 (2001).
- Sheng, G., Wang, X., Wu, S., Boyd, S.A. "Enhanced sorption of organic contaminants by smectitic soils modified with a cationic surfactant". *Journal of Environmental Quality* 27, 806-814 (1998).
- Sheramata, T.W., Hawari, J. "Cyclodextrins for desorption and solubilization of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites from soil". *Environmental Science and Technology*, 34, 3462-3472 (2000).

Shibata, A., Inoue, Y., Katayama, A. "Aerobic and anaerobic biodegradation of phenol derivatives in various paddy soils". *The Science of Total Environment*, 367 (2-3) 979-987 (2006).

Show y Hicks, K.A. "Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater". *Current Opinion in Biotechnology*, 16 (3) 246-253 (2005).

Silcox, G.D., Larsen, F.S., Owens, W.D., Chorroszy-Marshall, M. "Kinetics of hydrocarbon and pesticide removal from clay soils during thermal treatment in a pilot-scale rotary kiln". *Waste Management*, 15 (5-6), 339-349 (1995).

Singh, M., Sharma, R., Banerjee, U.C. "Biotechnological applications of cyclodextrins". *Biotechnology Advances*, 20, 341-359 (2002).

Skark, C., Zullei-Sribert, N., Willme, U., Gatzemann, U., Schlett, C. "Contribution of non-agricultural pesticides to pesticide load in surface water". *Pest Management Science*, 60, 525-530 (2004).

Smith, A.E., Aubin, A.J. "Degradation of Camidosulfuron in aqueous buffers and in acidic soil". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 2400-2403 (1993).

Sopeña, F., Bending, G.D. "Impacts of biochar on bioavailability of the fungicide azoxystrobin: A comparison of the effect on biodegradation rate and toxicity to the fungal community". *Chemosphere* 91 (11), 1525-1533 (2013).

Sopeña, F., Maqueda, C., Morillo, E. "Norflurazon mobility, dissipation, activity, and persistence in a sandy soil as influenced by formulation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, (9), 3561-3567 (2007b).

Sopeña, F., Villaverde, J., Maqueda, C., Morillo, E. "Photostabilization of the herbicide norflurazon microencapsulated with ethylcellulose in the soil-water system". *Journal of Hazardous Materials*, 195, (15) 298-305 (2011).

Sopeña, F., Laiz, L., Morillo, E., Sanchez-Trujillo, M.A., Villaverde, J., Jurado, V., Saiz-Jimenez, C. "Phenanthrene Biodegradation by *Pseudomonas xanthomarina* Isolated from an Aged Contaminated Soil". *Clean - Soil, Air, Water*, 42, (6) 785-790 (2014).

Sorensen, S.R., Albers, C.N., Aamand, J. "Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium". *Applied and Environmental Microbiology*, 2332-2340 (2008).

Sorensen, S.R., Juhler, R.K., Aamand, J. Degradation and mineralisation of diuron by *Sphingomonas* sp. SRS2 and its potential for remediating at a realistic $\mu\text{g L}^{-1}$ diuron concentration. *Pest Management Science*, 69, 11, 1239-1244 (2013).

Sorensen, S.R., Schultz, A., Jacobsen, O.S., Aamand, J. "Sorption, desorption, and mineralization of the herbicides glyphosate and MCPA in samples from two Danish soil and subsurface profiles". *Environmental Pollution*, 141 (1), 184-194 (2006).

Sorensen, S.R., Simonsen, A., Aamand, J. "Constitutive mineralization of low concentrations of the herbicide linuron by a *Variovorax* sp. Strain". *FEMS Microbiology Letters*, 292, (2) 291-296 (2009).

- Sorensen, S.R., Bending, G.D., Jacobsen, C.S., Walker, A., Aamand, J. "Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields". *FEMS Microbial Ecology*, 45, 1-11 (2003).
- Sparks, D.L., Corn, M. "Soil Descontamination". *Handbook of Hazardous Materials*, Academic Press, San Diego (1993).
- Stroud, J.L., Tzima, M., Paton, G.I., Semple, K.T. "Influence of hydroxypropyl-beta-cyclodextrin on the biodegradation of (14)C-phenanthrene and (14)C-hexadecane in soil". *Environmental Pollution*, 157, 2678-2683 (2009).
- Struger, J., Grabuski, J., Cagampan, S., Rondeau, M., Sverko, E., Marvin, C. "Occurrence and distribution of sulfonylurea and related herbicides in central Canadian surface waters 2006-2008". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 87, (4), 420-425 (2011).
- Suett, D.L., Jukes, A.A., Parekh, N.R. "Non-specific influence of pH on microbial adaptation and insecticide efficacy in previously-treated field soils". *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (12), 1783-1790 (1996).
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T., Harayama, S. "Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil". *Environmental Science & Technology*, 31, 45-51 (1997).
- Sun y Pignatello, J.J. "Photochemical reactions involved in the total mineralisation of 2,4-D by $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ". *Environmental Science and Technology*, 27, 304-310 (1993).
- Sun, B. Ling, W. Wang, Y. "Can root exudate components influence the availability of pyrene in soil?". *Journal of Soil and Sediments*, 13, 1161-1169 (2013).
- Sun, H., Tateda, M., Ike, M. "Short- and long-term sorption/desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons onto artificial solids: effects of particle and pore sizes and organic matters". *Water Research*, 37, 2960-2968 (2003).
- Sun, M., Luo, Y., Teng, Y., Jia, Z., Li, Z., Deng, S. "Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon and metal-contaminated soil by successive methyl- β -cyclodextrin-enhanced soil washing-microbial augmentation: a laboratory evaluation". *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 976-986 (2013).
- Swindell, A.L., Reid, B.J. "Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils". *Chemosphere*, 62, 1126-1134 (2006).
- Szejtli, J. "Introduction and general overview of ciclodextrin chemistry". *Chemical Reviews*, 98, 1743-1753 (1998).
- Szejtli, J. "Solubilization of cyclodextrins in industrial products and processes". *Journal of Materials Chemistry*, 7, 575-587 (1997).
- Szente, L. "Stable controlled-release organophosphorous pesticide entrapped in β -cyclodextrin". *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 51, 957-963 (1998).

Taboada E.R., DeKker A., Van Kammen-Polman A., Smelt J.H., Boesten J., Leistra M. "Adsorption, degradation and leaching of pirimicarb in orchard soils". *Science of the Total Environment*, 153, 253-260 (1994).

Tang, J., Alexander, M. "Mild extractability and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18 (12), 2711-2714 (1999).

Tejada, M., Benítez, C. "Organic amendment based on vermicompost and compost: differences on soil properties and maize yield". *Waste Management and Research*, 29, (11), 1185-1196 (2011).

Tejada, M., García-Martínez, A.M., Gómez, I., Parrado, J. "Application of MCPA herbicide on soils amended with biostimulants: Short-time effects on soil biological properties". *Chemosphere*, 80, 1088-1094 (2010).

Tejada, M., González, J.L., Hernández, M.T., García, C. "Application of different organic amendments in a gasoline contaminated soil: Effect on soil microbial properties". *Bioresource Technology*, 99, 2872-2880 (2008).

Teng, Y., Luo, Y., Ping, L., Zou, D., Li, Z., Christie, P. "Effects of soil amendment with different carbon sources and other factors on the bioremediation of an aged PAH-contaminated soil". *Biodegradation*, 21, 167-178 (2010).

Thevenot, M., Dousset, S., Rousseaux, S., Andreux, F. "Influence of organic amendments on diuron leaching through an acidic and a calcareous vineyard soil undisturbed lysimeters". *Environmental Pollution*, 153, 148-156 (2008).

Thomassin-Lacroix, E.J.M., Eriksson, M., Reimer, K.J., Hohn, W.W. "Bioestimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 551-556 (2002).

Thompson, I.P., Van der Gast, C.J., Ciric, L., Singer, A.S. "Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection". *Environmental Microbiology*, 7 (7), 909-915 (2005).

Thorn y Kennedy, K.R. "N NMR investigation of the covalent binding of reduced TNT amines to soil humic acid, model compounds, and lignocelluloses". *Environmental Science and Technology*, 36 (17), 3787-3796 (2002).

Tixier, C., Bogaerts, P., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Twagilimana, L., Cuer, A., Bohatier, J., Veschambre, H. "Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites". *Pest Management Science*, 56, 455-462 (2000).

Tixier, C., Sancelme, M., Aït-Aïssa, S., Widehem, P., Bonnemoy, F., Cuer, A., Truffaut, N., Veschambre, H. "Structure, ecotoxicity and fate of metabolites with soil fungi". *Chemosphere*, 46 (4), 519-526 (2002).

Tixier, C., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Cuer, A., Veschambre, H. "Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: synthesis, ecotoxicity, and biotransformation". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1381-1389 (2001).

Tomlin, C.D.S. Ed. Diurón. The pesticide manual Handbook 12th ed. *British Crop Protection Council*. Surrey, UK, 276-277 (2000).

Torstensson, L. "Use of herbicides on railway tracks in Sweden". *Pesticide Outlook*, 12 (1), 16-21 (2001).

Towell, M.G., Bellarby, J., Paton, G.I., Coulon, F., Pollard, Simon J.T., Semple, K.T. "Mineralisation of target hydrocarbons in three contaminated soils from former refinery facilities". *Environmental Pollution*, 159, 515-523 (2011a).

Towell, M.G., Paton, G.I., Semple, K.T. "The biodegradation of cable oil components: Impact of oil concentration, nutrient addition and bioaugmentation". *Environmental Pollution*, 159, 3777-3783 (2011b).

Trimble, A.J., Lydy, M.J. "Effects of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity in *Hyalella azteca*". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51, 29-34 (2006).

Turnbull, G.A., Cullington, J.E., Walker, A., Morgan, J.A.W. "Identification and characterization of a diuron-degrading bacterium". *Biology and Fertility of Soils*, 33, 472-476 (2001a).

Turnbull, G.A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E., Morgan, J.A.W. "Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D 47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, puhA". *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 2270-2275 (2001b).

Tyagi, M., da Fonseca, M.M.R., de Carvalho, C.C.C.R. "Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes". *Biodegradation*, 22, 231-241 (2011).

Ukrainczyk, L., Ajwa, H.A. "Pimisulfuron adsorption on minerals and soils". *Soil Science Society of America Journal*, 60, 460-467 (1996).

Undabeytia, T., Galán-Jiménez, M.C., Gómez-Pantoja, E., Vázquez, J., Casal, B., Bergaya, F., Morillo, E. "Fe-pillared clay mineral-based formulations of imazaquin for reduced leaching in soil". *Applied Clay Science*, 80-81, 382-389 (2013).

Undabeytia, T., Nir, S., Gomara, M.J. "Clay-vesicle interactions: fluorescence measurements and structural implications for slow release formulations of herbicides". *Langmuir* 20, 6605-6610 (2004a).

Undabeytia, T., Nir, S., rubin, B. "Organo-clay formulations of the hydrophobic herbicide norflurazon yield reduced leaching". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4767-4773 (2000a).

Undabeytia, T., Recio, E., Maqueda, C., Sánchez-Verdejo, T., Balek, V. "Slow diuron release formulations based on clay-phosphatidylcholine complexes". *Pest Management Science*, 67 (3), 271-278 (2011).

Undabeytia, T., Recio, E., Maqueda, C., Sánchez-Verdejo, T., Balek, V. "Slow diuron release formulations based on clay-phosphatidylcholine complexes". *Applied Clay Science*, 55, 53-61 (2012).

Undabeytia, T., Sanchez-Verdejo, T., Morillo, E., Maqueda, C. "Effect of organic amendments on the retention and mobility of imazaquin in soils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (14), 4493-4500 (2004b).

USEPA. 1999. Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storagetank sites. OSWER Directive Number 9200.4-17P. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington, DC.

Van Der Meer, I.M., Brouwer, M., Spelt, C.E., Mol, J.N.M., Stuitje, A.R. "The TACPyAT repeats in the chalcone synthase promoter of *Petunia hybrida* act as a dominant negative cis-acting module in the control of organ-specific expression". *Plant Journal*, 2 (4), 525-535 (1992).

Van Elsas, J.D., Jansson, J.K., Trevors, J.T. Ed. "Modern Soil Microbiology". Second Edition, Boca Ratón, Florida 33487-2742. ISBN-13: 978-0-8247-2749-9 (2007).

Venkateswaran, K., Hoaki, K.M.R., Maruyama, T. "Microbial degradation of resins fractionated from Arabian light crude oil". *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 418-424 (1995).

Ventura C.A., Puglisi G., Giammona G., Bottino F.A. "Comparative-Study on inclusion-compounds of 4-biphenylacetic acid with beta-cyclodextrin, hydroxypolpylated-beta-cyclodextrins, and methylated-beta-cyclodextrins". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 20, 2245-2265 (1994).

Viglianti, C., Hanna, K., Brauer, C., Germain, P. "Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged-contaminated soil using cyclodextrins: Experimental study". *Environmental Pollution*, 140, 427 – 435 (2006a).

Viglianti, C., Hanna, K., Brauer, C., Germain, P. "Use of cyclodextrins as an environmentally friendly extracting agent in organic aged-contaminated soil remediation". *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 56, 275 – 280 (2006b).

Villatoro-Monzón, W.R., Mesta-Howard, A.M., Razo-Flores, E. "Anaerobic biodegradation of BTEX using Mn (IV) and Fe (III) as alternative electron acceptors". *Water Science Technology*, 48 (6) 125-131 (2003).

Villaverde, J. "Time-dependent sorption of norflurazon in four different soils: Use of beta-cyclodextrin solutions for remediation of pesticide-contaminated soils". *Journal of Hazardous Materials*, 142, 184-190 (2007).

Villaverde, J., Hildebrandt, A., Martinez, E., Barceló, D., Morillo, E., Maqueda, C. "Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal". *Science of the Total Environment*, 390 (2-3), 507-513 (2008).

Villaverde, J., Kah, M., Brown, C.D., "Adsorption and degradation of four acidic herbicides in soils from southern Spain". *Pest Management Science*, 64, 703-710 (2008).

Villaverde, J., Maqueda, C., Morillo, E. "Effect of the simultaneous addition of β -cyclodextrin and the herbicide norflurazon on its adsorption and movement in soils". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (13), 4766-4772 (2006).

- Villaverde, J., Maqueda, C., Morillo, E. "Improvement of the desorption of the herbicide norflurazon from soils via complexation with β -cyclodextrin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5366 – 5372 (2005a).
- Villaverde, J., Maqueda, C., Undabeytia, T., Morillo, E. "Effect of various cyclodextrins on photodegradation of a hydrophobic herbicide in aqueous suspensions of different soil colloidal components". *Chemosphere*, 69 (4), 575-584 (2007).
- Villaverde, J., Morillo, E., Pérez-Martínez, J.I., Ginés, J.M., Maqueda, C. "Preparation and Characterization of Inclusion Complex of Norflurazon and β -Cyclodextrin to Improve Herbicide Formulation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (4), 864-869 (2004).
- Villaverde, J., Perez-Martinez, J.I., Maqueda, C., Gines, J.M., Morillo, E. "Inclusion complexes of alpha- and gamma-cyclodextrins and the herbicide norflurazon: I. Preparation and characterisation. II. Enhanced solubilisation and removal from soils". *Chemosphere*, 60, 656-664 (2005b).
- Villaverde, J., Posada-Baquero, R., Rubio-Bellido, M., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., Sánchez-Trujillo, M.A., Morillo, E. "Enhanced mineralization of diuron using a cyclodextrin-based bioremediation technology". *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9941-9947 (2012).
- Villaverde, J., Posada-Baquero, R., Rubio-Bellido, M., Morillo, E. "Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on diuron desorption and mineralisation in soils". *Journal of Soil and Sediments*, 13 (6), 1075-1083 (2013a).
- Villaverde, J., Rubio-Bellido, M., Posada-Baquero, R., Madrid, F., Morillo, E. "Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-based extraction for diuron bioaccessibility in an artificially contaminated soil". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93 (15), 1620-1627 (2013b).
- Vranova, V., Rejsek, K., Skene, K.R., Janous, D., Formanek, P. "Methods of collection of plant root exudates in relation to plant metabolism and purpose: a review". *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 176, 175-199 (2013).
- Vrielynck, L., Lapouge, C., Marquis, S., Kister, J., Dupuy, N. "Theoretical and experimental vibrational study of phenylurea: structure, solvent effect and inclusion process with the β -cyclodextrin in the solid state". *Spectrochimica Acta Part A*, 60, 2553-2559 (2003).
- Walker, A., Rodriguez-Cruz, M.S., Mitchell, M.J. "Influence of ageing of residues on the availability of herbicides for leaching". *Environmental Pollution*, 133, 43-51 (2005).
- Walkley, A., Black, I.A. "An examination of the Degtjereff method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration method". *Soil Science*. 37, 29-38 (1934).
- Wang, P. y Keller, A. A. "Sorption and desorption of atrazine and diuron onto water dispersable soil primary size fractions". *Water Research* 43, 1448-1456 (2009).
- Wang, Q., Xie, S., Hu, R. "Bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. Strain DAT1 for remediation of heavily atrazine-contaminated soil". *International Biodeterioration and Biodegradation*, 77, 63-67 (2013).

- Wang, X., Brusseau, M.L. "Solubilization of some low-polarity organic compounds by hydroxypropyl- β -cyclodextrin". *Environmental Science and Technology* 27, 2821-2825 (1993).
- Wanner, U., Burauel, P., Fuhr, F. "Characterisation of soil-bound residue fractions of the fungicide dithianon by gel permeation chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis". *Environmental Pollution*, 108, 53-59 (2000).
- Ware G. W. y Whitacre D. M. The Pesticide Book. 6th Edición Meister Media Worldwide. Willoughby, Ohio (2004).
- Wauchope R.D., Yeh S., Linders J.B., Kloskowski R., Tanaka K., Rubin B., Katayama A., Kördel W., Gerstl Z., Lane M., Unsworth J. "Pesticide sorption parameters : theory, measurements, uses, limitations and reliability". *Pest Management Science*, 58, 419-455 (2002).
- Weber, J.B. "Properties and behaviour of pesticides in soil. En: Mechanisms of pesticide movement into groundwater". Honeycutt & Schabacker (eds). Lewis Publishers, (1994).
- Wenz, G., Han, B.H., Müller, A. "Cyclodextrin Rotaxanes and Polyrotaxanes". *Chemical Reviews* 106, 782-817 (2006).
- Wenzel, W.W., Adriano, D.C., Salt, D., Smith, R. "Phytoremediation: a plant microbe based remediation system". In: Adriano, D.C., Bollag, J.M., Frankenberger, W.T., Sims, R.C (Eds.). *Bioremediation of Contaminated Soils*. ASA Monography nº37. Madison, WI, USA. pp. 456-508 (1999).
- White, J.C., Hunter, M., Pignatello, J.J., Alexander, M. "Increase in bioavailability of aged phenanthrene in soils by competitive displacement with pyrene". *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 1728-1732 (1999).
- Widehem, P., Aït-Aïssa, S., Tixier, C., Sancelme, M., Veschambre, H., Truffaut, N. "Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2". *Chemosphere*, 46, 527-534 (2002).
- Williams, C.F., Letey, J., Farmer, W.J. "Molecular weight of dissolved organic matter-napropamide complex transported through soil columns". *Journal of environmental Quality*, 31, 619-627 (2002).
- Williams, R.T., Ziegenfuss, P.S., Sisk, W.E. "Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions". *Journal of Industrial Microbiology*, 9, 137-144 (1992).
- Wischmann, H.; Steinhart, H. "The formation of PAH oxidation products in soils and soil/compost mixtures". *Chemosphere*, 35, 8, 1681-1698 (1997).
- Wong, F., Bidleman, T.F. "hydroxypropyl- β -cyclodextrin as non-exhaustive extractant for organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in muck soil". *Environmental Pollution*, 158, 1303-1310 (2010).
- Wu, G., Li, X., Kechavarzi, C., Sakrabani, R., Sui, H., Coulon, F. "Influence and interactions of multi-factors on the bioavailability of PAHs in compost amended contaminated soils". *Chemosphere*, 107, 43-50 (2014).

Yong, R.N., Mulligan, C.N. Ed. "Natural Attenuation of Contaminants in Soils". *Lewis Publishers*. Boca Ratón, Florida 33431. ISBN 1-56670-617-3 (2004).

Yu, H., Huang, G.H., A, C.J., Wei, J. "Combined effects of DOM extracted from site soil/compost and biosurfactant on the sorption and desorption of PAHs in a soil–water system". *Journal of Hazard Materials*, 190, 883-890 (2011).

Zhang, M., Li, J.X., Zhang, L.W., Chao, J.B. "Preparation and spectral investigation of inclusion complex of caffeic acid with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin". *Spectrochim. Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 71, 1891-1895 (2009).

Zhao, D.F., Liu, C.S., Liu, L.H., Zhang, Y.B., Liu, Q.Y., Wu, W.M. "Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation". *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 1244-1248 (2011).

Zimmermann J., Gonzalez J.M., Saiz-Jimenez C. "Detection and phylogenetic relationships of highly diverse uncultured acidobacterial communities in Altamira Cave using 23S rRNA sequence analyses". *Geomicrobiology Journal*, 22, 379-88 (2005).

Zmora-Nahum, S., Markovitch, O., Tarchitzky, J., Chen, Y. "Dissolved organic carbon (DOC) as a parameter of compost maturity". *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 2109-2116 (2005).

7. PUBLICACIONES

7. PUBLICACIONES

Los resultados experimentales a los que ha dado lugar este tiempo de formación de personal investigador en el marco de la presente Tesis Doctoral quedan recogidos en los siguientes medios de divulgación:

Revistas incluidas en SCI

- Rubio-Bellido, M., Villaverde, J., Madrid, F., Morillo, E. Assisted attenuation of a soil contaminated by diuron using hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and organic amendments. *Science of the Total Environment*. Septiembre 2014 (aceptado).
- Villaverde, J., Rubio-Bellido, M., Posada-Baquero, R., Madrid, F., Morillo, E. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin-based extraction for diuron bioaccessibility in an artificially contaminated soil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93 (15), 1620-1627 (2013b). SCI 1.162/ 133 de 205 en Environmental Science.
- Villaverde, J., Posada-Baquero, R., Rubio-Bellido, M., Morillo, E. Effect of hydroxypropyl- β -cyclodextrin on diuron desorption and mineralisation in soils. *Journal of Soils and Sediments*, 13 (6), 1075-1083 (2013a). SCI 1.863/ 8 de 33 en Soil Sciences.
- Villaverde, J., Posada-Baquero, R., Rubio-Bellido, M., Laíz, L., Saíz-Jimenez, C., Sanchez-Trujillo, M.A., Morillo, E. Enhanced Mineralization of Diuron Using a Cyclodextrin-Based Bioremediation Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9941-9947 (2012). SCI 2.532/ 1 de 35 en Agriculture, multidisciplinary.

Publicaciones no incluidas en SCI

- Villaverde J., Morillo E., Rubio-Bellido M. y Sánchez-Trujillo M.A. Recuperación de suelos contaminados mediante el uso de ciclodextrinas. *Agricultura. Revista agropecuaria*, 552-555 (2011).

Capítulo de libro

- Rubio-Bellido, M.; Villaverde, J.; Posada-Baquero, R; Morillo, E. Efecto de ciclodextrinas en la biodegradación de Diurón en un suelo contaminado. Libro Control de la Degradación y Restauración (Pags 103-106).
- Villaverde, J., Rubio-Bellido, M., Posada-Baquero, R., Morillo, E. Accelerated Diuron mineralisation in soil using cyclodextrin solutions. Published by the Institute of Chemical Technology, Prague. Book of Proceedings (pags 169-174), ISBN 978-80-7080-825-2. (Junio, 2012)
- Villaverde, J., Rubio-Bellido, M., Morillo, E. Descontaminación de suelos contaminados por diurón empleando soluciones de hidroxipropil-beta-ciclodextrinas. *Volumen XIV. Memorias de la Real Academia Sevillana de Ciencias*. (2011).

Aportaciones a congresos nacionales e internacionales

- M. Rubio-Bellido, E. Morillo., J. Villaverde. Evaluación del efecto de ciclodextrina en la atenuación natural de suelos contaminados por Diurón. VI Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo. Santiago de Compostela, 23-26 Junio, 2014. Póster.

- M. Rubio-Bellido, J. Villaverde, F. Madrid, E. Morillo. Biorrecuperación de un suelo agrícola contaminado por el herbicida Diurón. Aplicación de dos compost, nutrientes y HPBCD. VI Congreso Ibérico de la Ciencia del Suelo. Santiago de Compostela, 23-26 Junio, 2014. Póster.
- J. Villaverde, M. Rubio-Bellido, F. Madrid, E. Morillo. Efecto de la aplicación de diferentes enmiendas orgánicas, inorgánicas e hidroxipropil- β -ciclodextrina sobre un suelo agrícola contaminado por diurón. CICTA, Valencia, 1-4 Julio, 2013. Póster.
- M. Rubio-Bellido, R. Posada, E. Morillo. Diuron mineralization in soil affected by the use of hydroxypropyl- β -cyclodextrin and different amendments. 14th EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment. Barcelona, Junio 2013. Póster.
- M. Rubio-Bellido, J. Villaverde, R. Posada, E. Morillo. Efecto de ciclodextrinas en la biodegradación natural de diurón en un suelo contaminado. VI Simposio Nacional sobre Control de la Degradación y Restauración de Suelos. Almería, 4-7 Febrero 2013. Comunicación oral.
- J. Villaverde, M. Rubio-Bellido, E. Morillo. A Nonexhaustive Extraction Technique for Diuron risk assessment in an artificially contaminated soil. 7th European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment and 13th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides. Oporto, Portugal. Octubre 2012. Póster.
- J. Villaverde, M. Rubio-Bellido, R. Posada, E. Morillo. Accelerated Diuron Mineralisation in soil using ciclodextrin solutions. 5th International Symposium on Biosorption and Bioremediation. Praga, Junio 2012. Póster.
- J. Villaverde, M. Rubio-Bellido, R. Posada, M.A. Sánchez-Trujillo, E. Morillo. Recuperación de suelos contaminados por diurón empleando soluciones de hidroxipropil-beta-ciclodextrinas. I Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología Ambiental, y I congreso Nacional de la Sociedad Argentina de Ciencia y Tecnología Ambiental. Argentina, Junio 2012. Póster.
- J. Villaverde, M. Rubio-Bellido, R. Posada, L. Laiz, E. Morillo, C. Saiz. Improvement of Diuron Dissipation in Soil with Hydroxypropil-beta-Ciclodextrin Solutions. Pollutants in the Environment: Fate and Toxicity. Mérida, México, 2011. Póster.
- J. Villaverde, M. Rubio-Bellido, R. Posada, E. Morillo. Soluciones de Ciclodextrina empleadas como técnica de descontaminación de suelos contaminados por un herbicida hidrofóbico. VI Congreso Latinoamericano de Biología, Física y Química Ambiental. Arequipa, Perú, Octubre 2011. Póster.

Trabajos dirigidos

- Trabajo fin de Grado. Alba Lara Moreno. "Técnicas para la biorrecuperación de suelos contaminados". Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla). Defensa prevista Junio 2015.
- Trabajo Fin de Master. Jose Luis González Pimentel. "Descontaminación de suelos a través del desarrollo de tecnologías de recuperación de suelos contaminados por compuestos orgánicos persistentes combinando distintas técnicas químicas y biológicas usando compuestos naturales biodegradables que consigan incrementar la

biodisponibilidad de los contaminantes”. Licenciado en Ciencias Experimentales de la Facultad Pablo Olavide (Universidad de Sevilla). Defensa prevista Marzo 2015.

- Trabajo Fin de Carrera. Laura Ruda Gallardo. “Estudio del comportamiento y destino del herbicida Diurón en el sistema suelo-agua. Empleo de agentes químicos biodegradables para la descontaminación de suelos”. Escuela Universitaria de Ingenieros Técnicos Agrícolas (E.U.I.T.A.) (Universidad de Sevilla). Defensa Octubre 2014.